



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 92539 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07H017/08 A

A61K031/70 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.12.11

(30) *Prioridade:* 1988.12.19 GB 8829592

(43) *Data de publicação do pedido:*
1990.06.29

(45) *Data e BPI da concessão:*
04/95 1995.04.12

(73) *Titular(es):*

BEECHAM GROUP, LTD.
BEECHAM HOUSE G. W. ROAD BRENTFORD
MIDDLESEX TW8 9BD GB

(72) *Inventor(es):*

MICHAEL JOHN DRIVER GB
ALEXANDER RICHARD GREENLEES GB
DAVID TIMOTHY MACPHERSON GB

(74) *Mandatário(s):*

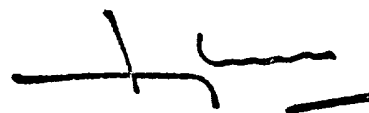
JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ
RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA
PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE ANFOTERICINA B

(57) *Resumo:*

[Fig.]

92.539



BEECHAM GROUP p.l.c.

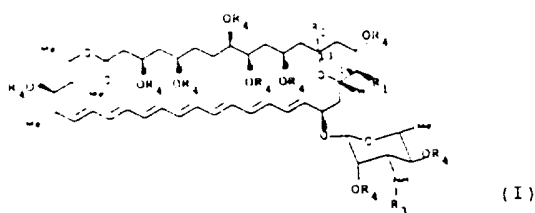
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE ANFOTERICINA B"

=====

MEMORIA DESCRITIVA

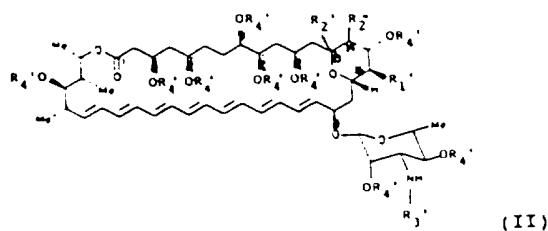
Resumo

O presente invento refere-se a um processo para a preparação dos compostos de fórmula (I), ou dos seus sais farmacologicamente aceitáveis,



na qual R_1 é um grupo $-X-Y$, em que X é um grupo carbonilo e Y é hidrogénio, alquilo C_{1-8} , alquenilo C_{2-8} , ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído; R_2 é hidróxi ou alcóxi C_{1-8} ; R_3 é hidrogénio ou um grupo de protecção de amina; e cada R_4 é hidrogénio. O presente invento refere-se também a um processo para a preparação de composições contendo os compostos de fórmula (I) e à sua utilização como agentes anti-fúngicos.

O referido processo consiste na reacção de um composto de fórmula (II):

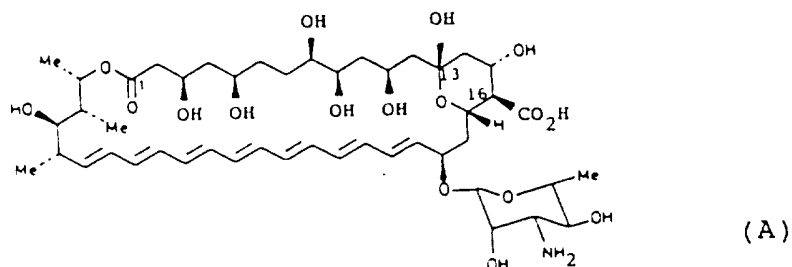


na qual R₁' é um derivado de ácido carboxílico activado; R₂' é alcóxi C₁₋₈ e R₂'' é hidrogénio, ou R₂' e R₂'' em conjunto representam uma ligação; R₃' é um grupo de protecção de amina; e cada um de R₄' é um grupo de protecção sililo, com, por exemplo, um reagente organometálico Y-M em que Y é alquilo C₁₋₈, alquênio C₂₋₈ ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído e M é um resíduo metálico, seguido, facultativamente ou se necessário, das reacções adicionais adequadas à obtenção de um composto de fórmula (I).

O presente invento refere-se a novos compostos, à sua preparação e à sua utilização no tratamento de infecções fúngicas em animais, incluindo seres humanos.

A anfotericina B de macrolido de polieno, produzida por Streptomyces nodosus, é muito utilizada no tratamento de infecções fúngicas.

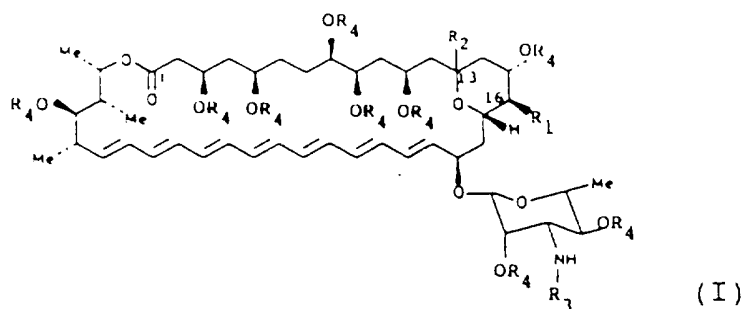
A anfotericina B é o único macrolido de polieno complexo cuja estrutura molecular e configuração absoluta foram bem determinadas por análise cristalográfica de raios-x. A anfotericina B tem a fórmula (A):



Numa tentativa de se satisfazer a necessidade de um agente anti-fúngico menos tóxico do que a anfotericina B preparam-se derivados de anfotericina B com um grupo de éster de alquilo inferior na posição-16 e sais de adição de ácido formados com o grupo de amina primária da metade de açúcar. Os derivados deste tipo são por exemplo descritos na Publicação da Patente Europeia 0 010 297 (Schering) e na Patente Norte Americana 4.235.993 (Squibb).

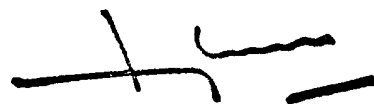
Prepararam-se agora novos derivados de anfotericina B, nos quais o grupo de carboxilo da posição-16 é substituído por um grupo funcional num estado de oxidação inferior, os quais mostraram ter actividade anti-fúngica e utilidade potencial como agentes anti-fúngicos.

Deste modo, o presente invento proporciona um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável:



na qual R_1 é um grupo $-X-Y$ em que X é um grupo carboxilo e Y é hidrogénio, alquilo C_{1-8} , alquenilo C_{2-8} , ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído; R_2 é hidróxi ou alcóxi C_{1-8} ; R_3 é hidrogénio ou um grupo de protecção de amina; e cada R_4 é hidrogénio.

A menos que indicado de outra forma, um grupo alquilo ou alquenilo tem desde 1 a 6 átomos de carbono e mais preferivelmente de 1 a 4 átomos de carbono, e pode ser de cadeia linear ou ramificada.



- 5 -

Quando aqui utilizado, o termo arilo compreende grupos carbocíclicos tais como fenilo e naftilo, de preferência fenilo.

O termo heteroarilo compreende heteroarilo monocíclico de 5 ou 6 membros e bicíclico de 9 ou 10 membros.

Além disso, o heteroarilo monocíclico de 5 ou 6 membros e bicíclico de 9 ou 10 membros contém de preferência um ou dois heteroátomos seleccionados entre azoto, oxigénio e enxofre, os quais, no caso de serem mais do que um heteroátomo, podem ser iguais ou diferentes. Quando o heteroarilo é o heteroarilo bicíclico de 9 ou 10 membros, os dois anéis são fundidos, de preferência com um anel de 5 ou 6 membros que contém um único heteroátomo.

Os substituintes facultativos para os grupos arilo e heteroarilo podem ser seleccionados entre OH, alquilo C_{1-6} , alcóxi C_{1-6} , halogénio e amino facultativamente substituído por alquilo C_{1-6} .

Os significados de R_1 são alcanóilo C_{1-6} , tal como formilo e acetilo, alquenoóilo C_{2-6} tal como pent-4-enoóilo, aroílo tal como benzoílo e heteroaróilo tal como 2-pirrolilcarbonilo.

Os significados de R_2 são hidróxi e metóxi, de preferência hidróxi.

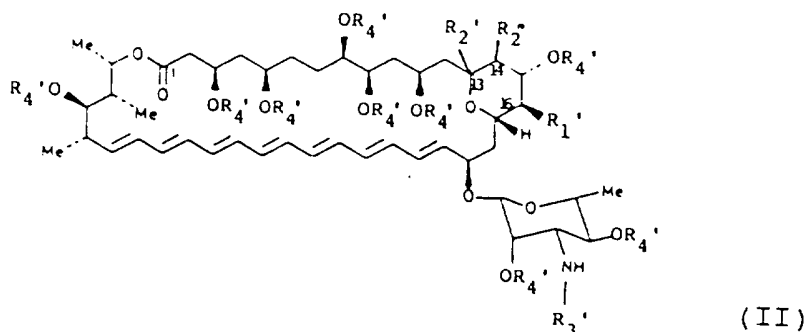
Os significados de R_3 são hidrogénio, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo, tricloroetoxycarbonilo, 2-metilsulfoniletoxycarbonilo e 2-trimetilsililetoxycarbonilo. De preferência, R_3 é hidrogénio, acetilo, trifluoroacetilo e 9-fluorenilmetoxycarbonilo. Mais preferivelmente, R_3 é hidrogénio.

Estão ainda também incluídos dentro do âmbito dos compostos em que R_3 é um grupo de protecção de amina os derivados de grupo de amino, em especial os derivados de acilo que suportam um substituinte básico tal como os derivados N-D-lisilo e N-D-or-nitilo, os derivados de guanidina e os derivados de N-glicosilo. A preparação de outros derivados de grupo de amino é descrita na Publicação da Patente Europeia 0 010 297 (Schering), Publicação da Patente Europeia 0 031 722 (Dumex) e na Patente Norte Americana 4 195 172.

O termo sal farmacologicamente aceitável abrange os solvatos e os hidratos. Deste modo, se os compostos de fórmula (I) ou os seus sais farmacologicamente aceitáveis formarem solvatos ou hidratos, estes também constituirão um aspecto do invento.

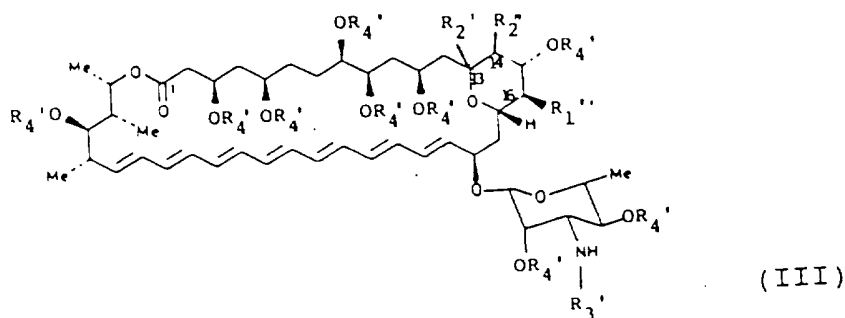
Os compostos de fórmula (I) em que R_3 é hidrogénio podem formar sais de adição de ácido com ácidos, tais como ácidos convencionais farmacologicamente aceitáveis, por exemplo clorídrico, bromídrico, fosfórico, acético, fumárico, salicílico, cítrico, láctico, mandélico, tartárico, oxálico, metanossulfónico, aspártico e ascórbico. O invento também se estende aos sais quaternários.

O presente invento também proporciona um processo para a preparação de compostos de fórmula (I) o qual consiste na reacção de um composto de fórmula (II):



na qual R_1' é um derivado de ácido carboxílico activado; R_2' é alcóxi C_{1-8} e R_2'' é hidrogénio, ou R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação; R_3' é um grupo de protecção de amina; e cada R_4' é um grupo de protecção de sililo, com:

(a) um reagente organometálico Y-M em que Y é alquilo C_{1-8} , alquênilo C_{2-8} ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído e M é um resíduo metálico, para produzir um composto de fórmula (III):



na qual R_1'' é um grupo $-X-Y$ em que X é um grupo carbonilo e Y é alquilo C_{1-8} , alquênilo C_{2-8} ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído; e em que R_2' , R_2'' , R_3' e R_4' são como definidos para a fórmula (II); ou

(b) um agente de redução, para produzir um composto de fórmula (III) em que R_1'' é $-\text{CH}_2\text{OH}$; e em que R_2' , R_2'' , R_3' e R_4' são como definidos para a fórmula (II),

seguida por oxidação do grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ R_1'' para produzir um composto de fórmula (III) em que R_1'' é $-\text{CHO}$; e em que R_2' , R_2'' , R_3' e R_4' são como definidos para a fórmula (II); e a seguir, facultativamente ou se necessário e por qualquer ordem apropriada, a conversão de R_1'' em R_1 , a conversão de R_2' em R_2 quando R_2'' é hidrogénio, ou a conversão de R_2' em R_2 e de R_2'' em hidrogénio quando R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação, a conversão de R_3' em R_3 , a remoção dos grupos de protecção de sililo R_4' , a interconversão de R_2 , a interconversão de R_3 e a formação de um sal farmacêuticamente aceitável.

Compreender-se-á que o termo derivado de ácido carboxílico activado, quando utilizado aqui relativamente à variante de processo (a) ou (b), compreende um grupo de ácido carboxílico modificado por reacção química para uma forma activada responsável pela transformação definida nessa variante de processo particular.

O termo "derivado de ácido carboxílico activado" compreende ésteres e tioésteres de alquilo, arilo e heteroarilo, haletos ácidos e anidridos ácidos, e amidas tais como amidas de N-metil-N-metóxi.

Um derivado de ácido carboxílico R_1' activado adequado para a reacção com um reagente organometálico ou com um agente de

redução é convenientemente um tioéster e, de preferência, é um heteroariltioéster tal como piridiltioéster.

Favoravelmente, R_1' é um 2-piridiltioéster.

A reacção com um reagente organometálico ou com um agente de redução pode ser efectuada por utilização de um composto de fórmula (II) em que R_2' é alcóxi, de preferência metóxi ou etóxi e R_2'' é hidrogénio, ou por utilização de um composto de fórmula (II) em que R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação, ou de misturas dos mesmos. Favoravelmente, utiliza-se um composto de fórmula (II) em que R_2' e R_2'' em conjunto são uma ligação.

Os grupos de protecção de amina R_3' são escolhidos de modo que não reajam desfavoravelmente com o reagente organometálico, com o agente de redução ou com o agente de oxidação. De preferência, um grupo de protecção de amina R_3' é rapidamente removível a seguir às transformações definidas nas variantes de processo (a) e (b) para produzir um composto de fórmula (I) no qual R_3 é hidrogénio.

Os valores de R_3' compreendem acetilo, trifluoroacetilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo, tricloroetoxycarbonilo, 2-metilsulfoniletoxycarbonilo e 2-trimetilsililetoxycarbonilo.

Na variante de processo (a), R_3' é convenientemente acetilo ou trifluoroacetilo, de preferência trifluoroacetilo.

Na variante de processo (b), R_3' é convenientemente acetilo ou 9-fluorenilmetoxycarbonilo, de preferência 9-fluorenilmetoxycarbonilo.

Os grupos de protecção de sililo R_4' adequados são trimetilsililo, trietilsililo e t-butildimetilsililo.

De preferência, R_4' é trietilsililo.

Os reagentes organometálicos (Y-M) para a reacção com os compostos de fórmula (II) de acordo com a variante de processo (a) compreendem os reagentes nos quais o elemento metálico do resíduo metálico (M) pode ser magnésio, lítio, cobre, zinco, manganésio ou cádmio.

De preferência, o reagente organometálico é um haleto de organomagnésio ou um Reagente de Grignard, tal como um brometo ou iodeto de organomagnésio, por exemplo brometo de metilmagnésio, brometo de fenilmagnésio ou brometo pirrolilmagnésio.

A reacção com o reagente organometálico pode ser efectuada sob condições normalmente utilizadas nestas reacções, por exemplo empregando-se reagentes anidros sob uma atmosfera inerte e a temperatura reduzida.

O composto de fórmula (II) é de preferência feito reagir com um excesso de um Reagente de Grignard, por exemplo desde 2 a 30 equivalentes molares e de preferência desde 5 a 15 equivalentes molares, num solvente inerte tal como tetraidrofuran ou dietiléter. A reacção é normalmente efectuada a uma temperatura reduzida dentro da gama que varia entre -78°C e a temperatura ambiente e de preferência dentro da gama que varia entre -20°C e a temperatura ambiente. Os tempos de reacção podem variar entre 0,1 e 6 horas, mas geralmente é suficiente um tempo de reacção entre 0,1 e 1 hora.



Se o Reagente de Grignard for um haleto de alquenilmagnésio e estiver presente num excesso molar, dever-se-á compreender que a ligação dupla deve ser submetida a uma reacção de adição com mais reagente de Grignard para produzir uma metade de alquenilo de cadeia alongada.

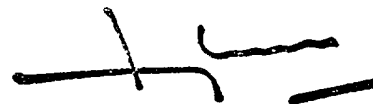
Um agente de redução adequado para a reacção com os compostos de fórmula (II) de acordo com a variante de processo (b) é o boroidreto de lítio. A reacção pode ser efectuada num solvente inerte tal como éter dietílico ou tetraidrofurano, de preferência éter dietílico.

A oxidação do grupo $-CH_2OH$ R_1'' resultante pode ser efectuada por utilização de condições de oxidação de Swern modificadas, tais como uma mistura de anidrido trifluoroacético, sulfóxido de dimetilo, trietilamina e 1,1,3,3-tetrametilureia em diclorometano.

Nos compostos de fórmula (III) em que R_2' é alcóxi C_{1-8} e R_2'' é hidrogénio, R_2' pode ser convertido num hidróxi R_2 sob condições catalisadas por ácido depois da remoção dos grupos de protecção de sililo R_4' , por utilização de água ou de uma mistura de água e de tetraidrofurano como solvente, de preferência por utilização de uma mistura de solventes compreendendo 10-50% de água em tetraidrofurano.

Da mesma forma, os compostos de fórmula (III), em que R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação, podem ser hidratados sob condições catalisadas por ácido para produzirem os compostos de fórmula (I), em que R_2 é hidroxil.

Um catalisador ácido adequado para estas reacções é o ácido 10-canforsulfónico ou o p-tolueno sulfonato de piridínio.



- 12 -

Os compostos de fórmula (III) em que R_2' e R_2'' em conjunto formam uma ligação podem ser convertidos directamente em compostos de fórmula (I) em que R_2 é alcóxi C_{1-8} pela adição catalisada por ácido do álcool de alquilo C_{1-8} apropriado, ou alternativamente, indirectamente através da hidratação inicial da ligação dupla, seguida pela permuta do grupo de hidroxilo R_2 , formado desta maneira, por utilização do álcool de alquilo C_{1-8} apropriado. Estas conversões são efectuadas sob condições anidras, convenientemente na presença de ácido 10-canforsulfónico, ou p-tolueno sulfonato de piridínio.

Quando R_3 nos compostos de fórmula (I) é hidrogénio, a conversão de um grupo de protecção de amina R_3' rapidamente removível pode ser efectuada sob condições básicas.

Pode-se remover um grupo de protecção de amina R_3' tal como trifluoroacetilo por utilização de uma base tal como amónia ou carbonato de potássio em metanol anidro.

Um grupo de protecção de amina R_3' , tal como 9-fluorenilmetoxicarbonilo, pode ser removido sob condições básicas num solvente tal como sulfóxido de dimetilo metanólico. Bases adequadas para desprotecção de amina incluem amónia, dialquilaminas tais como dimetilamina e dietilamina, trialquilaminas tais como trietilamina, aminas cíclicas e especialmente aminas secundárias cíclicas tais como morfolina, piperazina e mais especialmente piperidina, e bases diazabíciclicas tais como 1,5-diazabíciclo[4.3.0]non-5-eno (DBN) e de preferência 1,8-diazabíciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

A desprotecção da amina pode ser efectuada por utilização de 1-10 equivalentes de base, de preferência desde 1-2 equivalentes, a uma temperatura reduzida ou elevada, por exemplo

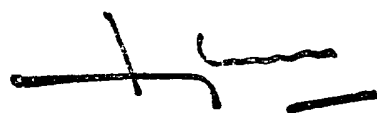
desde -30°C até 50°C e de preferência desde 0°C até à temperatura ambiente, durante um período de tempo que varia entre 1 minuto e 5 horas e de preferência entre 30 minutos e 2,5 horas.

Os grupos de protecção de sililo R_4' nos compostos de fórmula (III) podem ser removidos por utilização de métodos de desprotecção conhecidos, por exemplo por utilização de uma solução de fluoreto de hidrogénio-piridina em tetraidrofurano, a uma temperatura normal ou reduzida, por exemplo entre -10°C e 50°C e mais preferivelmente entre 0°C e a temperatura ambiente, durante um período de tempo que pode ir até 60 horas e que varia de preferência entre 4 e 24 horas.

Os compostos intermediários de fórmula (II) podem ser preparados a partir do produto natural anfotericina B por realização das seguintes etapas por qualquer ordem apropriada:

- (a) activação do grupo carbóxi da posição-16 para produzir um derivado de ácido carboxílico activado R_1' ;
- (b) permuta selectiva do grupo de hidroxilo anomérico da posição-13 para produzir um grupo de alcóxi $C_{1-8} R_2'$ ou preparação de um composto em que R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação;
- (c) protecção da função amina da metade de açúcar da posição-19 com um grupo de protecção de amina R_3' .
- (d) conversão dos grupos de hidroxilo livres em $-OR_4'$ em que R_4' é um grupo de protecção de sililo.

O grupo carboxilo da posição-16 pode ser convertido num 2-piridiltioéster R_1' por utilização de cloroformato de



2-tiopiridilo num solvente inerte tal como tetraidrofurano, éter dietílico ou diclorometano, de preferência éter dietílico, a temperaturas que variam entre uma temperatura reduzida e uma temperatura elevada, tal como entre -20°C e 50°C , de preferência entre 0°C e a temperatura ambiente.

O grupo de hidroxilo anomérico da posição-13 pode ser permutado selectivamente por utilização do álcool de alquilo C_{1-8} na presença de um catalisador ácido tal como ácido 10-canforsulfónico ou p-tolueno sulfonato de piridínio sob condições anidras. A reacção pode ser efectuada num solvente inerte tal como tetraidrofurano e o álcool pode actuar total ou parcialmente como solvente. A reacção é convenientemente efectuada na presença de um depurador- H_2O , tal como crivos moleculares e/ou sob uma atmosfera inerte.

Os grupos de protecção de amina R_3' podem ser introduzidos por processos "standard". Por exemplo, um grupo de protecção de amina de acetilo ou de trifluoroacetilo R_3' pode ser introduzido por reacção da amina primária com anidrido acético, ou trifluoroacetato de etilo, na presença de uma base tal como diisopropiletilamina, numa mistura de solventes de metanol-sulfóxido de dimetilo ou metanol-dimetilformamida a uma temperatura normal ou reduzida, por exemplo a 0°C .

Pode-se introduzir um grupo de protecção de amina 9-fluorenilmetoxycarbonilo R_3' por adição de cloroformato de 9-fluorenilmetilo a uma solução da amina primária em metanol-dimetilformamida sob condições anidras, na presença de uma base tal como carbonato de potássio.

Alternativamente, pode-se introduzir um grupo de 9-fluorenilmetoxycarbonilo R_3' por adição de

N-(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida a uma mistura pastosa da amina primária em metanol-dimetilformamida sob condições anidras na presença de uma base tal como piridina.

Os grupos de hidroxilo livres podem ser sililados por utilização de processos padrão. A reacção com agentes de sililação tais como trifluorometanossulfonato de trimetilsililo e trifluorometanossulfonato de trietilsililo pode ser efectuada num solvente inerte, por exemplo diclorometano, hexano ou éter dietílico, sob uma atmosfera inerte a temperaturas reduzidas, por exemplo entre 0°C e 5°C. A reacção é convenientemente levada a cabo por utilização de um excesso de agente de sililação na presença de uma base fraca, por exemplo um derivado de piridina tal como 2,6-lutidina. Alternativamente, quando for um líquido, a base pode substituir o solvente. O tempo de reacção depende da dimensão do grupo sililo e pode variar desde alguns minutos para um grupo de trimetilsililo até várias horas para grupos de sililo superiores.

A introdução de grupos de protecção de sililo R_4' é acompanhada pela eliminação total ou parcial do substituinte da posição-13, de tal modo que, nos compostos de fórmula (II), as variáveis R_2' e R_2'' podem ser alcóxi C_{1-8} e hidrogénio respectivamente, ou R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação. A extensão da eliminação varia de acordo com o solvente: é importante quando o solvente é o diclorometano, mas é insignificante quando o solvente é n-hexano ou éter dietílico.

Se a reacção de sililação resultar numa mistura de compostos, estes podem ser separados por técnicas cromatográficas. Alternativamente, a preparação dos compostos de fórmula (I) pode ser efectuada por utilização de uma mistura de compostos de fórmula (II).

Determinados compostos intermediários de fórmula (II) e (III) e os seus precursores preparados a partir da anfotericina B são compostos novos e como tal fazem parte do invento.

Se necessário, os compostos de fórmula (I), em que R_2 é hidróxi e/ou R_3 é hidrogénio, podem ser convertidos nos compostos de fórmula (I), em que R_2 é alcóxi C_{1-8} e/ou R_3 é um grupo de protecção de amina, por utilização das etapas (b) e (c) anteriormente descritas para a preparação dos compostos intermediários de fórmula (II).

Os compostos de fórmula (I) e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis são agentes anti-fúngicos potencialmente úteis para o combate de infecções fúngicas em animais, incluindo os seres humanos. Por exemplo, eles são potencialmente úteis para o tratamento tópico de infecções fúngicas no ser humano provocadas por, entre outros organismos, espécies de Candida, Trichophyton, Microsporum ou Epidermophyton, ou infecções das mucosas provocadas por Candida albicans (por exemplo, aftas e candidíase vaginal). Eles podem também ser utilizados no tratamento de infecções fúngicas sistémicas causadas por, por exemplo, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Coccidioides, Paracoccidioides, Histoplasma ou Blastomyces spp. Eles podem também ser utilizados no tratamento do micetoma eumicótico, da cromoblastomicose e ficomicose.

O presente invento proporciona ainda uma composição farmacêutica que compreende um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável em associação com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável. A composição é de preferência destinada a utilização em seres humanos sob a forma de um comprimido, cápsula, solução injectável ou creme.

Para utilização em seres humanos, os compostos anti-fúngicos de fórmula (I) ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser administrados isoladamente, mas normalmente são administrados em mistura com um veículo farmacêutico escolhido tendo em consideração a via de administração pretendida e a prática farmacêutica corrente. Por exemplo, eles podem ser administrados oralmente na forma de um comprimido que contenha excipientes tais como amido ou lactose, ou na forma de uma cápsula ou óvulo, isoladamente ou em mistura com excipientes, ou na forma de um elixir ou suspensão que contenha um agente aromatizante ou corante. Eles podem ser injectados parentericamente, por exemplo, intravenosa, intramuscular ou subcutaneamente. Para administração parentérica, eles são melhor utilizados na forma de uma solução esterilizada aquosa que pode conter outras substâncias, por exemplo, sais ou glicose em quantidade suficiente para tornar a solução isotónica.

Para administração oral ou parentérica a doentes humanos, a dosagem diária dos compostos anti-fúngicos de fórmula (I) pode variar entre 0,1 e 1 mg/kg (em doses divididas), quando administrada quer pela via oral, quer pela via parentérica. Assim, os comprimidos ou cápsulas dos compostos deverão conter desde 5 mg até 0,5 g do composto activo para administração individual ou em duas ou mais vezes conforme for apropriado. O médico determinará de acordo com as circunstâncias a dosagem mais adequada para um doente individual, a qual variará em função da idade, peso e reacção do doente em questão. As dosagens anteriores são exemplificativas do caso médio. Poderão haver, evidentemente, casos particulares em que são necessárias gamas de dosagem superiores ou inferiores e estas estão dentro do âmbito deste invento.

Alternativamente, os compostos anti-fúngicos de fórmula (I) podem ser administrados na forma de um supositório ou de um pessário, ou podem ser aplicados topicamente na forma de uma loção, solução, creme, pomada ou pó. Por exemplo, eles podem ser incorporados num creme à base de uma emulsão aquosa de polietileno glicóis ou parafina líquida; ou podem ser incorporados, com uma concentração entre 1 e 10%, numa pomada que consiste numa base de cera branca ou parafina macia branca, se necessário associada a estabilizadores e preservativos.

Dentro da gama de doses indicada, não se observaram efeitos toxicológicos prejudiciais com os compostos do invento que impessam a sua administração a doentes que necessitem de ser tratados contra infecções fúngicas.

O presente invento proporciona ainda um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável destinado a ser utilizado substância terapêutica activa.

Um composto útil como substância terapêutica activa é adequado para o tratamento de doenças em animais incluindo os seres humanos. Conforme referido anteriormente, os compostos de fórmula (I) e os seus sais farmacologicamente aceitáveis possuem actividade anti-fúngica e são potencialmente úteis no combate de infecções fúngicas em animais incluindo os seres humanos.

Deste modo, o presente invento proporciona ainda um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável destinado a ser utilizado no tratamento de infecções fúngicas.

O presente invento proporciona ainda um método de tratamento de infecções fúngicas em animais, incluindo os seres humanos, o qual compreende a administração ao animal de uma

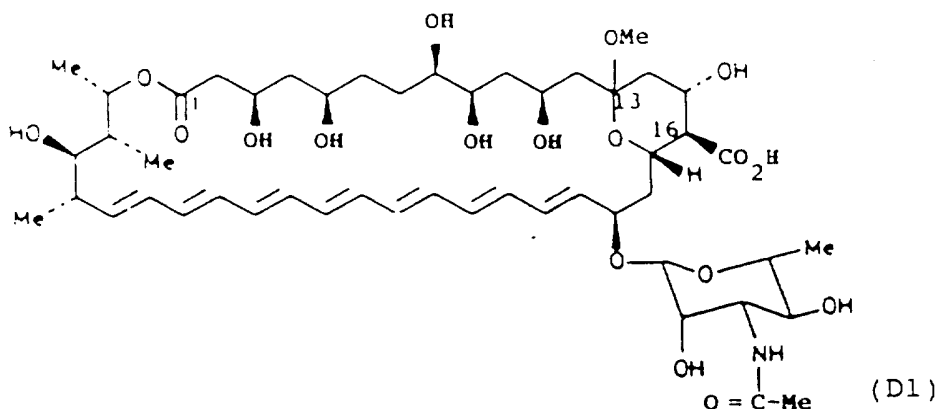
quantidade anti-fúngica eficaz de um composto de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável.

O presente invento proporciona ainda a utilização de um composto de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável na produção de um medicamento para utilização como substância terapêutica activa na tratamento de infecções fúngicas em animais, incluindo seres humanos.

Os seguintes Exemplos ilustram a preparação dos compostos do invento e as seguintes Descrições ilustram a preparação dos seus intermediários.

Descrição 1

N-Acetil-13-O-metil-anfotericina B (D1)



Agitaram-se anfotericina B¹ de N-acetilo (0,70 g, 0,71 mmole) e ácido d-10-canforsulfónico anidro (0,06 g, 0,25 mmole) numa mistura de metanol seco (15 ml) e tetraidrofurano (2,5 ml) à

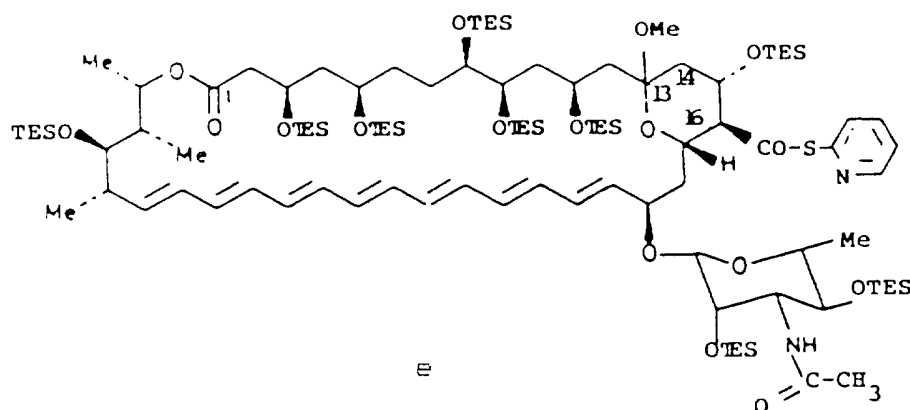
temperatura ambiente, sob azoto, durante 0,5 horas. Adicionou-se trietilamina (0,03 g, 0,04 ml, 0,26 mmole), a mistura foi concentrada para aproximadamente 3 ml e foi adicionada a dietiléter (400 ml). O precipitado foi filtrado e lavado com acetato de etilo para produzir o composto do título (D1) sob a forma de um pó amarelo.

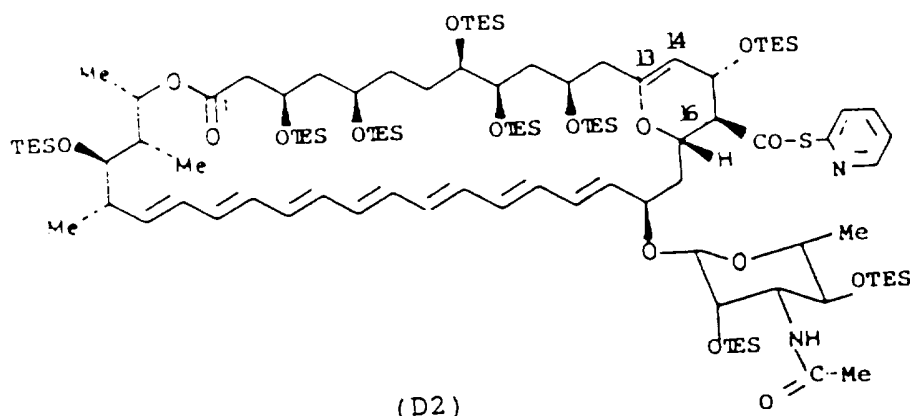
Clar: Coluna de fase invertida DDS 5µ 250 x 4,6 mm; eluente 78% de metanol - 22% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção: 4,8 minutos.

¹ Nicolau *et al.*, J. American Chem. Soc., 110, 4660, (1988).

Descrição 2

éster de (2-piridiltio) de N-acetil-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,-
2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B e éster de (2-piridiltio)
de N-acetil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-an-
droanfotericina B (D2)





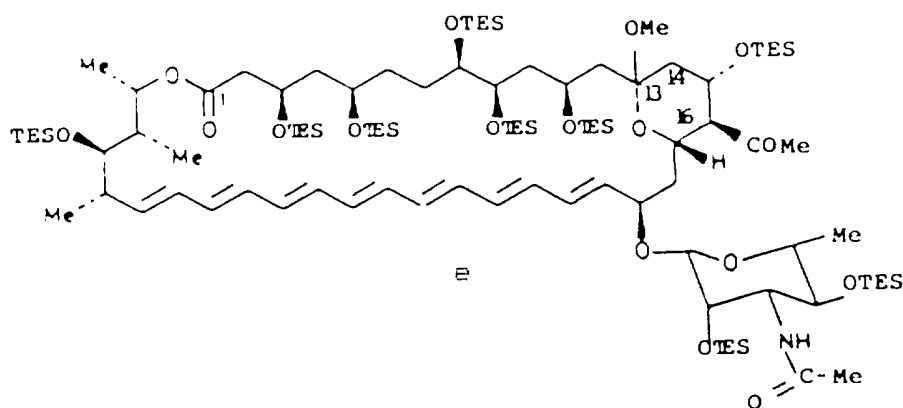
Suspendeu-se *N*-acetil-13-O-metil-anfotericina B (D1) (0,94 g, 0,95 mmole) em diclorometano seco (50 ml) a 0°C, sob uma atmosfera de azoto, e adicionou-se por meio de uma seringa 2,6-luïidina (1,98 g, 2,15 ml, 18,50 mmoles) seguida por sulfonato de trifluorometano de trietilsililo (3,76 g, 3,22 ml, 14,00 mmoles). Após agitação a 0°C durante 40 minutos, a mistura foi deitada numa solução de éter dietílico/bissulfato de sódio 0,2M arrefecido no gelo. O produto foi extraído em éter dietílico e os extractos orgânicos foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e evaporados in vacuo.

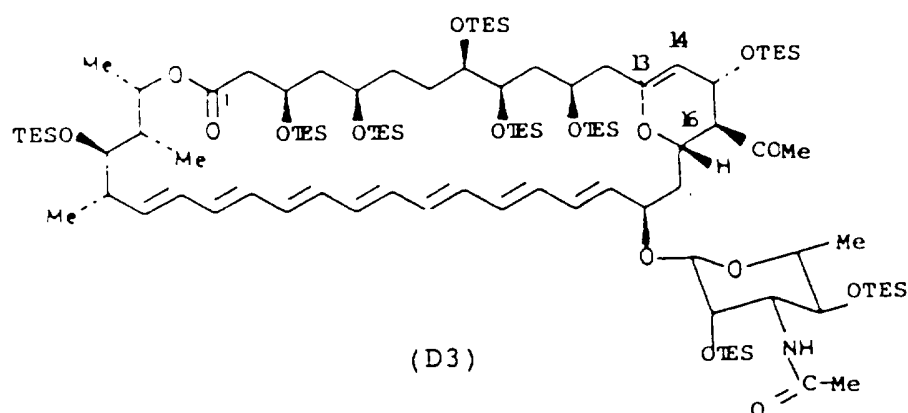
O produto em bruto foi agitado a 0°C em éter dietílico seco (15 ml) e foi tratado com trietilamina (106 mg, 0,15 ml, 1,04 mmoles) seguida por cloroformato de 2-tiopiridilo (180 mg, 5,3 ml de uma solução de 34 mg/ml em diclorometano, 1,04 mmoles). Após agitação a 0°C durante 30 minutos, a mistura foi diluída com éter dietílico (50 ml), foi seca sobre sulfato de magnésio anidro, foi filtrada e evaporada in vacuo. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel, eluindo-se com misturas de *n*-hexano/acetato de etilo produziu uma mistura dos compostos do título sob a forma de uma espuma amarela.

CLAR. Fase normal - Coluna de sílica comprimida radialmente por água. Eluente: acetato de etilo a 15% em *n*-hexano - 2 ml/min. Comprimento de onda de detecção 406 nm. Tempos de retenção: Produto mais importante (derivado de 13-O-metilo) 6,3 minutos. Produto menos importante (derivado de 13,14-anidro) 7,0 minutos.

Descrição 3

N-Acetil-16-acetil-16-descarbóxi-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',-4'-nona-O-trietilsililanfotericina B e N-acetil-16-acetil-16-descarbóxi-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B (D3)





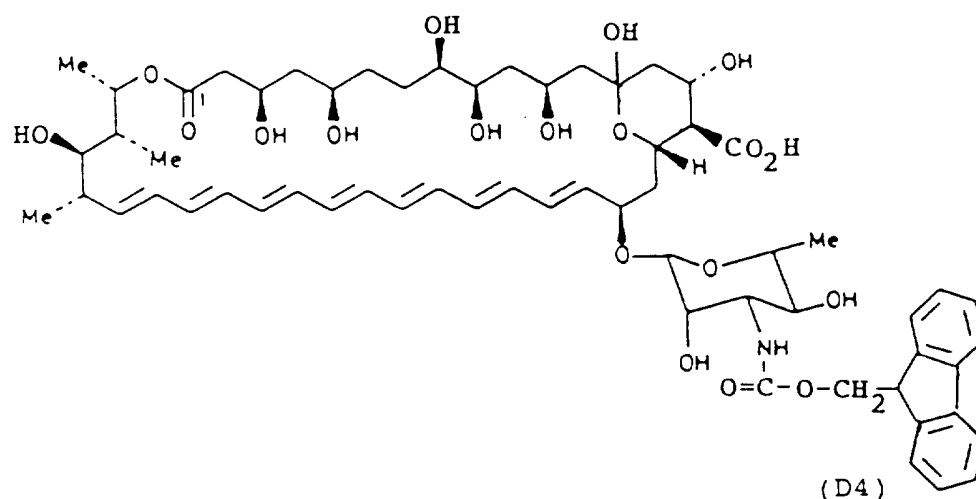
A mistura de produtos da Descrição 2 foi agitada a 0°C em tetraidrofurano seco (5 ml) sob uma atmosfera de azoto e adicionou-se por meio de uma seringa brometo de metil magnésio (0,37 ml de uma solução 3M em éter dietílico, 1,11 mmoles). Ao fim de 15 minutos a 0°C, adicionou-se mais 0,37 ml de uma solução de brometo de metilmagnésio e a mistura foi agitada durante mais 10 minutos a 0°C. A mistura foi deitada em éter dietílico/água e o produto foi extraído em éter dietílico. Os extractos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e concentrados in vacuo. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel, eluindo-se com éter dietílico a 4% em diclorometano produziu uma mistura dos compostos do título.

CLAR. Fase normal - Condições semelhantes às descritas na Descrição 2.

Tempos de retenção: Produto mais importante (derivado de 13-O-metil-) 3,0 minutos. Produto menos importante (derivado de 13,14-anidro) 3,6 minutos.

Descrição 4

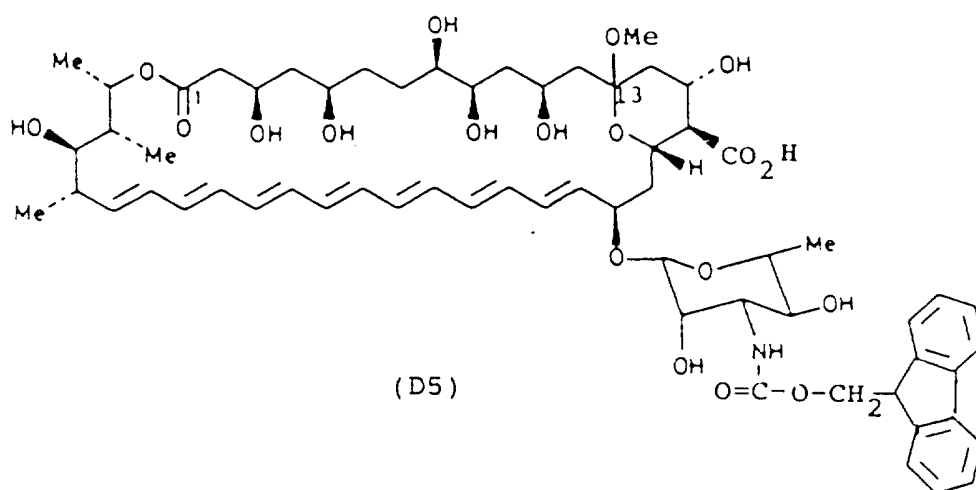
N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B (D4)



A uma solução de anfotericina B (0,50 g, 0,54 mmole) e carbonato de potássio anidro (0,17 g, 1,2 mmoles) em dimetilsulfóxido seco (10 ml) e metanol seco (2 ml), sob uma atmosfera de azoto a 0°C, adicionou-se cloroformato de 9-fluorenilmetilo sólido (0,21 g, 0,81 mmole). Depois de se agitar durante uma hora, adicionou-se mais uma porção de cloroformato de 9-fluorenilmetilo (0,04 g, 0,17 mmole). Ao fim de 0,25 horas, deitou-se a mistura de reacção em água destilada (200 ml). O precipitado foi recolhido por centrifugação, foi dissolvido em metanol e foi evaporado in vacuo. O resíduo foi dissolvido num mínimo de volume de uma mistura de tetraidrofurano e metanol (1:1) e foi deitada em água destilada (200 ml, ajustada para pH 3,2 por meio da adição de ácido acético glacial). O precipitado foi centrifugado, lavado com água e seco in vacuo para produzir o composto do título (D4) que foi utilizado sem purificação adicional.

Descrição 5

N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-13-O-metilanfotericina B (D5)



Método A

N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B (1,85 g, 1,61 mmoles) e ácido d-10-canforsulfônico (156 mg, 0,67 mmole) foram agitados em tetraidrofurano seco (10 ml)/metanol (60 ml) à temperatura ambiente sob azoto. Ao fim de 15 minutos, adicionou-se trietilamina (0,14 ml, 102 mg, 1,01 mmoles), a mistura foi filtrada, foi concentrada para cerca de 10 ml e foi deitada em dietiléter/n-hexano (800 ml 1:1). O produto precipitado foi recolhido por centrifugação, foi lavado com dietiléter/etilacetato (1:1) e foi seco para produzir o composto do título (DS) sob a forma de um pó amarelo.

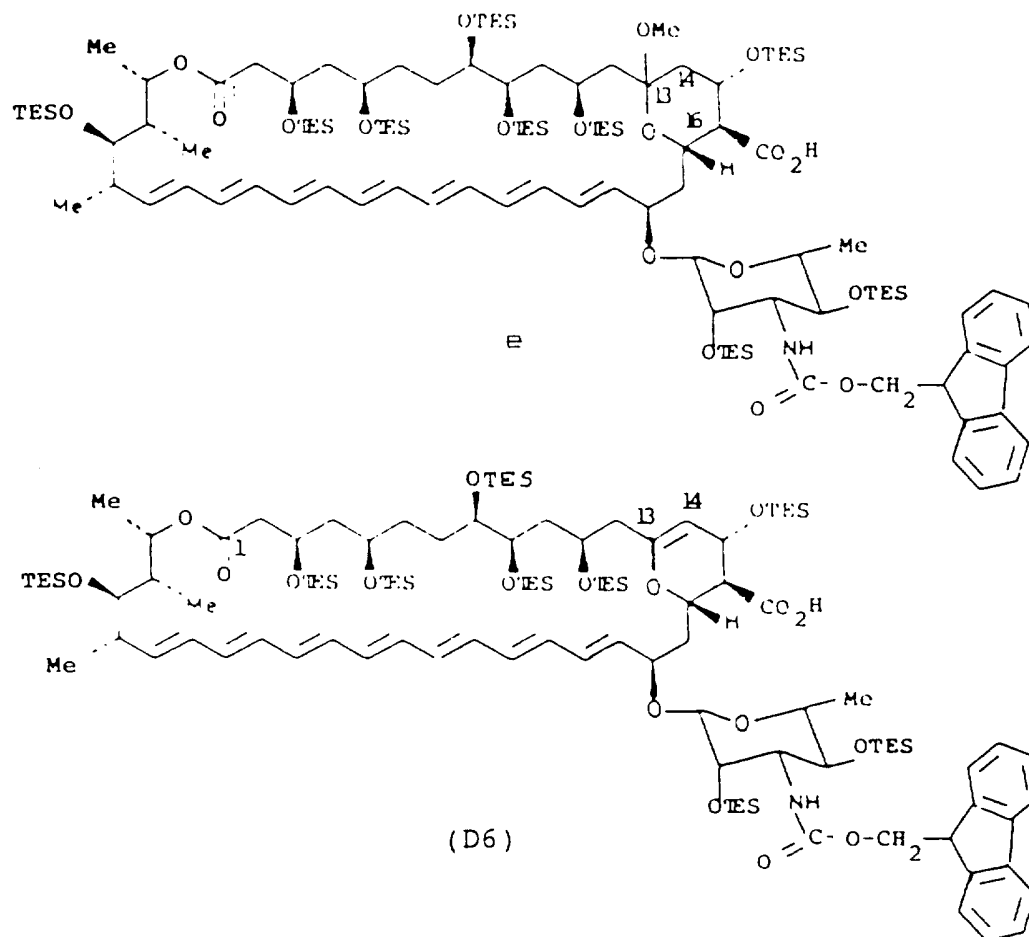
Método B

N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B (4,99 g, 4,35 mmoles) e p-toluenossulfonato de piridínio (5,04 g, 20,1 mmoles) foram agitados em metanol (450 ml)/tetraidrofurano (150 ml) à temperatura ambiente durante 1,5 horas. Adicionou-se trietilamina (2,65 g, 3,65 ml, 26,2 mmoles), a mistura foi concentrada para 30 ml e adicionada a uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 l). O produto precipitado foi recolhido por filtração, foi lavado com água e foi seco para produzir o composto do título (DS) sob a forma de um pó amarelo.

CLAR: Coluna de fase invertida ODS 5 μ 250 x 4,6 mm; eluente 80% de metanol - 20% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção: 7,6 minutos.

Descrição 6

N-(Fluorenilmetoxycarbonilo)-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-
-nona-O-trietilsililanfotericina B e N-(Fluorenilmetoxycarboni-
lo)-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-
-anidroanfotericina B (D6)



Método A

O produto da Descrição 5 (1,52 g) foi suspenso em diclorometano seco (60 ml) a 0°C sob a azoto e adicionou-se por meio de uma seringa 2,6-lutidina (2,55 g, 2,76 ml, 23,80 mmoles) seguida por trifluorometanosulfonato de trietilsililo (4,89 g, 4,16 ml, 18,50 mmoles). Depois de se ter agitado a 0°C durante 30 minutos, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em n-hexano, foi filtrado e o filtrado foi reconcentrado para proporcionar um óleo castanho. A purificação por meio de coluna cromatográfica sobre sílica gel, eluindo-se com misturas de n-hexano/acetato de etilo, produziu os dois produtos principais.

As fracções contendo o produto 13,14-anidro mais polar foram lavadas com uma solução de gelo/sulfato de hidrogénio de sódio 0,20M para retirar a lutidina, foram secas sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtradas e evaporadas.

A N-(fluorenilmetoxycarbonilo)-13-Q-metil-3,5,8,9,11,-15,35,2',4'-nona-Q-trietilsililanfotericina B menos polar apresenta:

Rf 0,54 (sílica) - acetato de etilo a 25% em η -hexano.

^1H 400MHz ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): 7,88(2H, d, J 7,5Hz), 7,70(2H, d, J 7,4Hz, 7,43(2H, t, J 7,5Hz), 7,34(2H, t, J 7,5Hz), 6,63-6,10(12H, séries de m), 5,97(1H, dd, J 5,3, 15,7Hz), 5,50(1H, dd, J 9,5, 14,8Hz), 5,37(1H, d, J 9,8Hz), 4,75-4,62(2H, m), 4,53(1H, s), 4,51(1H, dd, J 6,4, 10,4Hz), 4,44(1H, dt, J 4,6, 10,3Hz), 4,35(1H, dd, J 6,5, 10,4Hz), 4,28-4,18(2H, m), 4,14(1H, m), 4,06-3,96(2H, m), 3,90(1H, d, J 2,6Hz), 3,86(1H dd, J 2,5, 8,8Hz) 3,71(1H, m), 3,65-3,56(2H, m), 3,46(1H, t, J 9,1Hz), 3,31 (1H, m), 3,14(3H, s), 2,65-2,52(2H, m), 2,44(1H, m), 2,32(1H, t, J 10,4Hz), 2,20-1,47(15H, series de m), 1,25(3H, d, J 6,1Hz), 1,18(3H, d, J 6,0Hz), 1,11-0,88(87H, series de m), 0,82-0,53(54H, series de m)ppm.

O próton de ácido carboxílico não foi observado.

IV " μ "_{máx} (película fina):

3945, 3500-2500 (ν amplo fraco), 2958, 2915, 2880, 1733 (shoulders at 1720, 1710), 1509, 1459, 1413, 1379, 1308, 1237, 1190, 1108, 1077, 1004, 901, 860, 830, 739 cm^{-1} .

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA) massa observada MH^+ 2187. Calculada para $\text{C}_{117}\text{H}_{211}\text{NO}_{19}\text{Si}_9\text{H}^+$, 2187.

O produto mais polar N-(fluorenilmetoxicarbonilo)-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona- α -trietsilil-13,14-anidroanfotericina B apresenta:

Rf 0,40 (sílica) - acetato de etilo a 25% em η -hexano.

^1H 400MHz ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : 7,88(2H, d, J 7,5Hz), 7,70(2H, d, J 7,5Hz), 7,43(2H, t, J 7,4Hz), 7,34(2H, t, J 7,4Hz), 6,56-6,11(12H, series de m), 5,99(1H, dd, J 6,0, 15,4Hz), 5,55(1H, dd, J 9,4, 14,9Hz), 5,34(1H, d, J 9,9Hz), 4,80(1H, d, J 8,7Hz), 4,73-4,60(2H, m), 4,63(1H, s), 4,59(1H, s), 4,50(1H, dd, J 6,5, 10,4Hz), 4,35(1H, dd, J 6,5, 10,4Hz), 4,32-4,17(3H, m), 4,12(1H, m), 4,01(1H, m), 3,90(1H, d, J 2,7Hz), 3,85(1H, dd, J 2,8, 8,7Hz), 3,80-3,66(2H, m), 3,61(1H, dt, J 2,7, 9,7Hz), 3,45(1H, t, J 9,1Hz), 3,34(1H, m), 2,64(1H, dd, J 8,7, 10,8Hz), 2,61-2,50(2H, m), 2,43(1H, m), 2,40-2,28(1H, m), 2,24-2,15(1H, m), 2,08-1,88(5H, series de m), 1,83-1,47(6H, series of m), 1,25(3H, d, J 6,1Hz), 1,18(3H, d, J 6,0Hz), 1,10-0,88(87H, series de m), 0,77-0,56(54H, series de m)ppm. O próton de ácido carboxílico não foi observado.

IR ν_{max} película fina : 3445, 3500-2500 (amplo fraco), 1737 (bossa a 1720), 1680, 1510, 1461, 1416, 1380, 1310, 1240, 1192, 1169, 1080, 1007, 977, 740, 672 cm^{-1} .

Espectro de massa: FAB (Matriz 3-NOBA) Massa observada: MH^+ 2155,5. Calculado para : $\text{C}_{116}\text{H}_{207}\text{NO}_{18}\text{Si}_9\text{H}^+$, 2155.

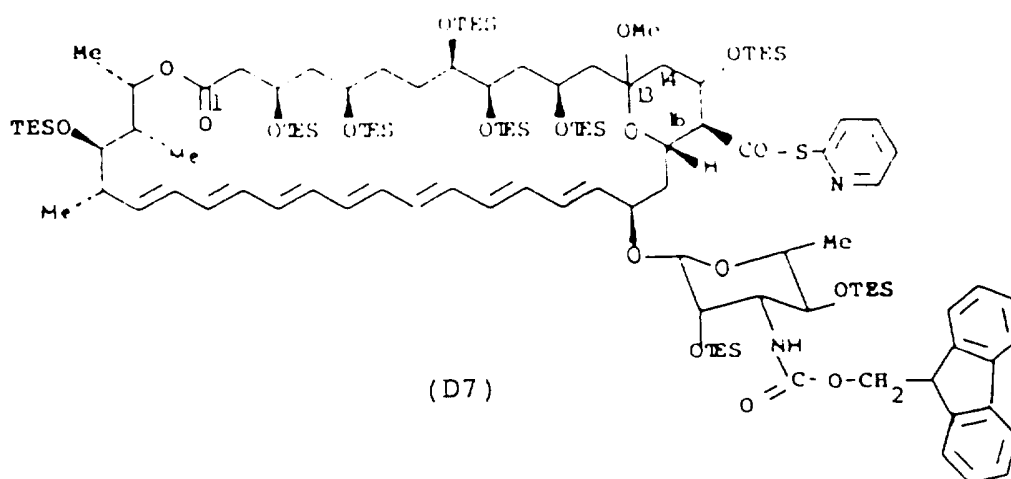
Método B

N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-13-O-metilanfotericina B (D5) (4,97 g, 4,3 mmoles) foi suspensa em η -hexano seco (150 ml) a 0°C sob azoto e foi tratada com 2,6-lutidina (8,3 g, 8,9 ml, 77 mmoles) seguida por trifluorometanossulfonato de trietilsililo (15,8 g, 13,6 ml, 60 mmoles). Depois de se agitar a 0°C durante 2 horas, adicionaram-se mais porções de 2,6-lutidina (4,5 ml) e adicionou-se trifluorometanossulfonato de trietilsililo (6,8 ml) em duas porções intervaladas de 15 minutos. A agitação continuou durante mais uma hora e a mistura foi filtrada e concentrada in vacuo. A purificação por cromatografia sobre sílica gel (eluigão com misturas de acetato de etilo/ η -hexano) produziu, sob a forma

de uma espuma amarela alaranjada, um produto principal individual, como o produto menos polar do Método A.

Descrição 7

(2-Piridiltio)éster de N-(fluorenilmetoxycarbonilo)-13-O-metil-
-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B (D7)



O produto 13-O-metilo da Descrição 6 (823 mg, 0,38 mmole) foi agitado a 0°C em éter dietílico seco (15 ml) e foi tratado com trietilamina (50 mg, 0,07 ml, 0,49 mmole) seguida por cloroformato de 2-tiopiridilo (105 mg, 3 ml de 35 mg/ml de solução em diclorometano). Depois de se agitar a 0°C durante 30 minutos, a mistura foi diluída com éter dietílico (80 ml), foi seca sobre sulfato de magnésio, foi filtrada e foi evaporada in vacuo. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel, eluindo-se com acetato de etilo a 10% em *n*-hexano, produziu o composto do título sob a forma de uma espuma amarela alaranjada.

Rf 0,45 (sílica) - acetato de etilo a 15% em n-hexano.

δ H 270MHz ((CD₃)₂CO) 8,73(1H, d, J 5Hz), 7,95(1H, dt, J 7,5, 2Hz), 7,88(2H, d, J 7,2Hz), 7,73(1H, d, J 7,5Hz), 7,71(2H, d, J 7Hz), 7,50-7,25(5H, m), 6,70-6,08(12H, series de m), 5,97(1H, dd, J 5,5, 15Hz), 5,50(1H, dd, J 9,6, 15Hz), 5,30(1H, d, J 9,6Hz), 4,78(1H, m), 4,65(1H, m), 4,62(1H, s), 4,56-4,42(2H, m), 4,38-3,96(6H, series de m), 3,92(1H, d, J 3Hz), 3,87(1H, dd, J 9, 3Hz), 3,77-3,55(3H, m), 3,50-3,35(2H, m), 3,13(3H, s), 2,77(1H, t, J 9Hz), 2,59(2H, d, J 6,4Hz), 2,44(1H, m), 2,32(1H, dd, J 6,4, 14Hz), 2,15-1,40(14H, series de m), 1,23(3H, s, J 5Hz), 1,18(3H, s, J 6Hz), 1,15-0,86(87H, m), 0,85-0,45(54H, series de m)ppm.

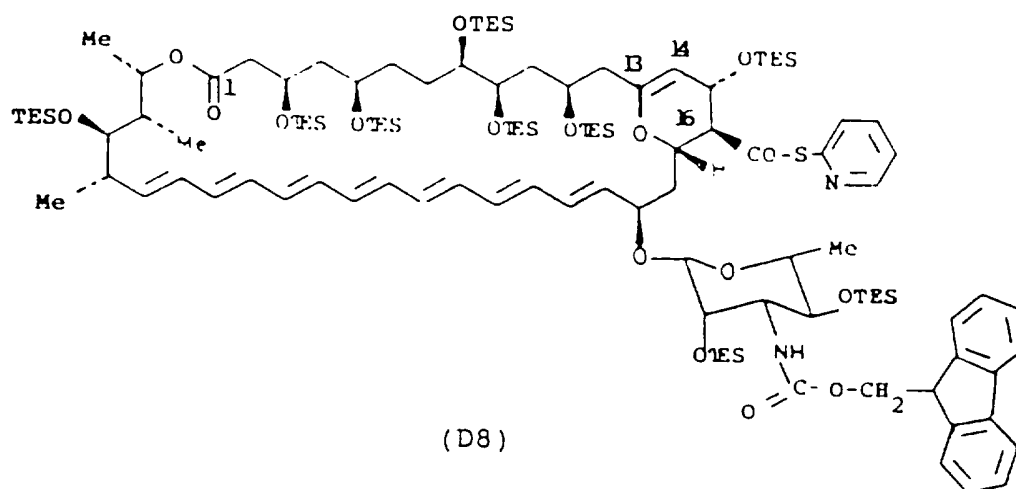
IV "nu"_{máx} (película fina):

: 3459, 2965, 2920, 2888, 1737
(bossa a 1710), 1578, 1510, 1460, 1418, 1382, 1312,
1241, 1115, 1080, 1010, 740cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na). Massa observada MNa⁺ 2302. Calculada para C₁₂₂H₂₁₄N₂O₁₈Si₉Na⁺, 2302.

Descrição 8

(2-Piridiltio)éster de N-(9-fluorenilmtoxycarbonilo)-3,5,8,9,-
11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13-14-anidroanfotericina B
(D8)



N-(9-Fluorenilmtoxycarbonilo)-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-tri-
 etilsilil-13-14-anidroanfotericina B (460 mg, 0,21 mmole) foi
 tratada como na Descrição 7 com trietilamina (24 mg, 0,03 ml,
 0,24 mmole) e cloroformato de 2-tiopiridilo (52 mg, 1,50 ml de
 uma solução de 35 mg/ml em diclorometano) em éter dietílico (12
 ml). O tratamento e purificação produziu o composto do título
 (D8) sob a forma de um sólido vítreo amarelo.

- 34 -

Rf 0,28 (sílica) - acetato de etilo a 10% em n-hexano.

δ H 270MHz ((CD₃)₂CO) : 8,73(1H, d J 4Hz), 7,94(1H, dt, J 8, 2Hz), 7,88(2H, d, J 8Hz), 7,74(1H, d, J 8Hz), 7,71(2H, d J 8Hz), 7,50-7,27(5H, m), 6,65-6,15(12H, series de m), 6,0(1H, dd, J 15, 7Hz), 5,65(1H, dd, J 9, 14Hz), 5,32(1H, d, J 10Hz), 4,90-4,60(2H, m), 4,74(1H, s), 4,66(1H, s), 4,51(1H, dd, J 10, 7Hz), 4,40-3,65(10H, series de m), 3,93(1H, d, J 3Hz), 3,86(1H, dd, J 8, 2Hz), 3,50-3,35(2H, m), 3,03(1H, dd, J 11, 9Hz), 2,65-1,40(16H, series de m), 1,23(3H, d, J 6Hz), 1,18(3H, d, J 6Hz), 1,16-0,85(87H, séries de m), 0,85-0,45(54H, séries de m)ppm

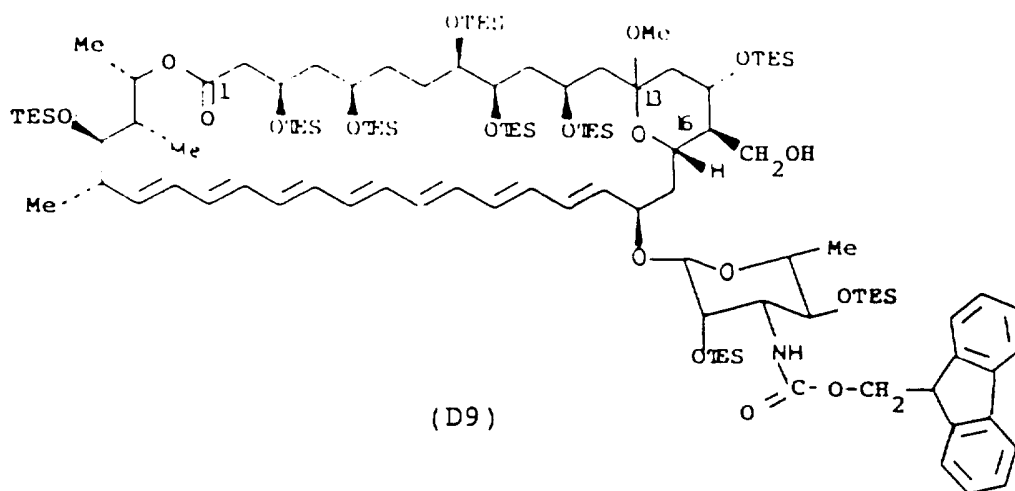
IV "nu" máx (película fina):

: 3457, 3020, 2962, 2920,
2883, 1736, 1705, 1679, 1577, 1508, 1460, 1420, 1383,
1311, 1240, 1192, 1169, 1080, 1007, 836, 730cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa⁺ 2270. Calculada para C₁₂₁H₂₁₀N₂O₁₇Si₉S Na⁺, 2270.

Descrição 9

N-(9-Fluorenilmtoxycarbonilo)-16-descarbóxi-16-hidroximetil-13-
-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B
(D9)



Método A

(2-Piridiltio)éster de N-(fluorenilmtoxycarbonilo)-13-O-metil-
-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B (D7)
(61 mg, 0,03 mmole) foi agitada a uma temperatura entre -10°C e a
temperatura ambiente em tetraidrofurano seco (2 ml) e foi tratada
com boroidreto de lítio (0,9 ml de uma solução 0,57 M em tetrai-
drofurano, 0,51 mmole, adicionado em três porções durante 30
minutos). Após agitação durante a noite à temperatura ambiente,
adicionou-se mais boroidreto de lítio (6,0 mg, 0,28 mmole) e a
agitação continuou durante mais três horas. A mistura foi
arrefecida até -78°C, foi temperada com uma solução saturada de
cloreto de amónio e foi deixada atingir a temperatura ambiente.
O produto foi extraído em éter dietílico e os extractos orgânicos
foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e

concentrados. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel, eluindo-se com éter dietílico a 0-2% em diclorometano produziu o composto do título (D9) sob a forma de um vidro amarelo.

Método B

(2-Piridiltio)éster de N-(fluorenilmtoxycarbonilo)-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B (D7) (3,26 g, 1,43 mmoles) foi agitada em éter dietílico (60 ml), sob azoto à temperatura ambiente, e foi tratada com boroidreto de lítio (0,150 g, 6,89 mmoles). Ao fim de 2 horas, a mistura foi arrefecida até 0°C, adicionou-se uma solução saturada de cloreto de amónio e a mistura foi agitada vigorosamente durante alguns minutos. O produto foi extraído em éter dietílico e os extractos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e depois concentrados in vacuo. A purificação por meio de cromatografia "flash" sobre sílica gel (eluindo-se com misturas de éter/diclorometano) produziu o composto do título (D9) sob a forma de um sólido vítreo amarelo.

Rf 0,44 (sílica), éter dietílico a 2% em diclorometano.

^1H 400MHz ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,87(2H, d, J 7,5Hz), 7,69(2H, d, J 7,4Hz), 7,43(2H, t, J 7,4Hz), 7,34(2H, t, J 7,4Hz), 6,54-6,10(12H, series de m), 6,06(1H, dd, J 15,4 6,1Hz), 5,51(1H, dd, J 14,8, 9,7Hz), 5,37(1H, d, J 9,8Hz), 4,78(1H, s), 4,78-4,62(2H, m), 4,48(1H, dd, J 10,4, 6,5Hz), 4,34(1H, dd, J 10,4, 6,5Hz), 4,30-4,08(4H, m), 4,05-3,76(6H, m), 3,74-3,58(3H, m), 3,47(1H, t, J 9,0Hz), 3,35(1H, m), 3,12(3H, s), 2,63-2,50 (2H, m), 2,48-2,36(2H, m), 2,12(1H, dd, J 12,3, 4,4Hz), 2,07-1,25(14H, series de m), 1,25(3H, d, J 6,1Hz), 1,18(3H, d, J 6,0Hz), 1,14-0,85(87H, series de m), 0,80-0,53(54H, series de m)ppm.

Não se observou o próton OH.

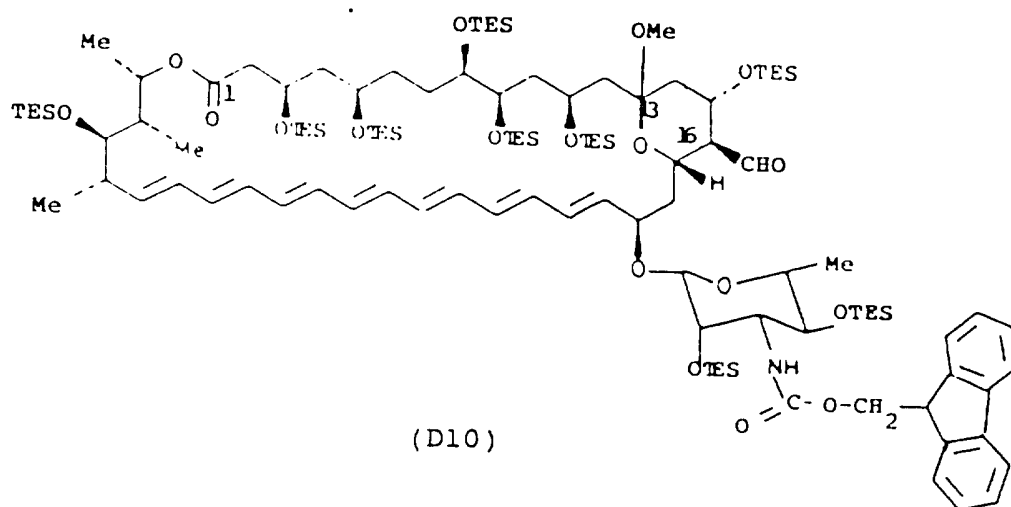
IV "nu" $_{\text{máx}}$ (película fina):

3600-3300 (weak, broad), 3450, 2958, 2915, 2879, 1737, 1510, 1461, 1414, 1380, 1309, 1240, 1193, 1110, 1078, 1007, 905, 839, 740, 725, 674 cm^{-1} .

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NORA/Na) massa observada MNa^+ 2195. Calculada para $\text{C}_{117}\text{H}_{213}\text{NO}_{18}\text{Si}_9\text{Na}^+$, 2195.

Descrição 10

N-(9-Fluorenilmetoxycarbonilo)-16-descarbóxi-16-formil-13-O-me-
til-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B
(D10)



Uma mistura de dimetil sulfóxido (109 mg, 0,09 ml, 1,30 mmoles) e tetrametilureia (151 mg, 0,16 ml, 1,30 mmoles) em diclorometano seco (4 ml) foi agitada a -78°C sob azoto e adicionou-se gota a gota por meio de uma seringa anidrido trifluoroacético (136 mg, 0,092 ml, 0,65 mmoles). Ao fim de 15 minutos, adicionou-se por meio de uma cânula o álcool da Descrição 9 (141 mg, 0,07 mmoles) em diclorometano (4 ml). A mistura foi agitada durante 1,5 horas a uma temperatura entre -78°C e -60°C , antes da adição gota a gota de trietilamina (132 mg, 0,18 ml, 1,30 mmoles). Depois de se agitar durante mais 15 minutos a -78°C , a mistura foi deixada atingir a temperatura ambiente antes de ser temperada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. O produto foi extraído em éter dietílico e os extractos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e evaporados. A cromatografia "flash" sobre sílica gel

(eluição com éter dietílico a 1% em diclorometano) produziu o composto do título sob a forma de um sólido vítreo amarelo alaranjado.

Rf: 0,72 (sílica), éter dietílico a 2% em diclorometano.

δC 67,8MHz ((CD₃)₂CO): 204,2, 170,5, 156,3, 145,1, 142,2, 139,3, 135,6, 135,4, 135,0, 134,7, 134,2, 133,6, 132,5, 132,4, 132,2, 131,5, 131,3, 130,6, 128,5, 127,8, 125,8, 125,7, 120,8, 101,4, 98,6, 76,7, 76,3, 76,0, 74,5, 74,0, 73,5, 73,2, 71,1, 67,4, 67,3, 67,2, 65,2, 62,9, 58,1, 48,3, 48,0, 45,8, 44,3, 43,4, 42,3, 41,4, 40,8, 36,3, 35,6, 27,5, 20,0, 19,3, 19,0, 11,2, 7,64, 7,61, 7,5, 7,3, 7,1, 6,8, 6,6, 6,4, 6,2, 5,9, 5,8, 5,6, 5,4ppm.

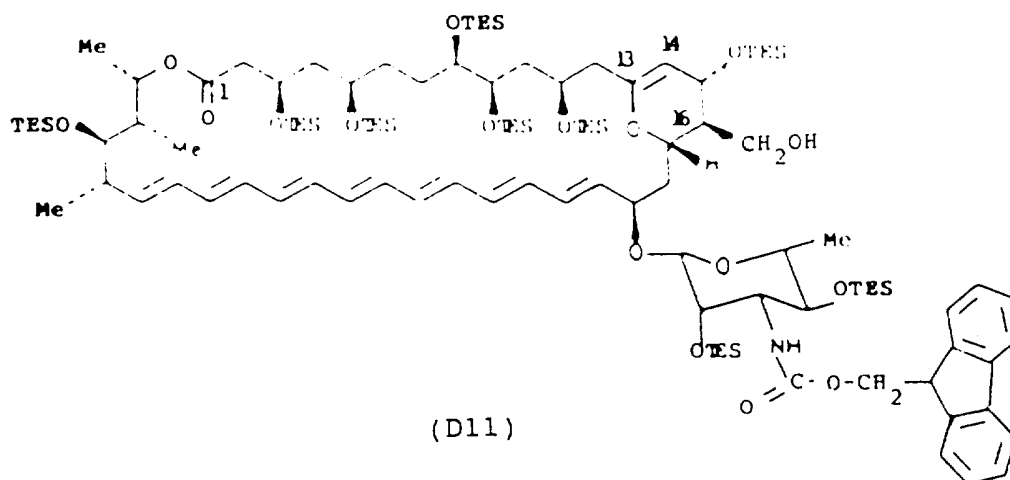
IV "nu" máx (película fina):

: 3452, 2957, 2912, 2879, 2730
(fraco), 1733, 1503, 1459, 1412, 1378, 1309, 1240, 1190, 1110, 1079, 1007, 977, 903, 862, 833, 740, 671cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NDBA) massa observada M⁺ 2170.
Calculada para C₁₁₇H₂₁₁NO₁₈Si₉, 2170.

Descrição 11

N-(9-Fluorenilmetoxicarbonilo)-16-descarbóxi-16-hidroximetil-
-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfoteri-
cina B (D11)



Uma mistura de (2-Piridiltio)éster de N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo)-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13-14-anidroanfotericina B (D8) (282 mg, 0,13 mmole) e boroidreto de lítio (16,40 mg, 0,75 mmole) foi agitada em tetraidrofurano seco (10 ml) sob azoto à temperatura ambiente. Ao fim de 18 horas, a mistura foi arrefecida até -78°C, foi temperada com uma solução saturada de cloreto de amónio e a sua temperatura foi deixada atingir a temperatura ambiente. O produto foi extraído em éter dietílico e os extractos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e evaporados. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel (elução com éter dietílico a 1-3% em diclorometano) produziu o composto do título sob a forma de um vidro amarelo.

Rf: 0,40 (sílica), éter dietílico a 1% em diclorometano.

δ H 270MHz ((CD₃)₂CO) : 7,88(2H, d, J 7,4Hz), 7,70(2H, d, J 7,4Hz), 7,46-7,34(4H, m), 6,60-6,05(13H, séries de m), 5,55(1H, dd, J 9, 14Hz), 5,39(1H, d, J 10,6Hz), 4,75-3,65(18H, series de m, incluindo 4,73(1H,s), 4,65(1H, d, J 2Hz), 3,93(1H, d, J 3Hz)), 3,60(1H, dt, J 3,0, 9,5Hz), 3,46(1H, t, J 9,0Hz), 3,31(1H, m) 2,58(2H, m), 2,50-1,45(15H, series de m), 1,25(3H, d, J 6,1Hz), 1,18(3H, d, J 6,7Hz), 1,15-0,80(87H, séries de m), 0,75-0,45(54H, séries de m)ppm.

Não se observou o protão OH.

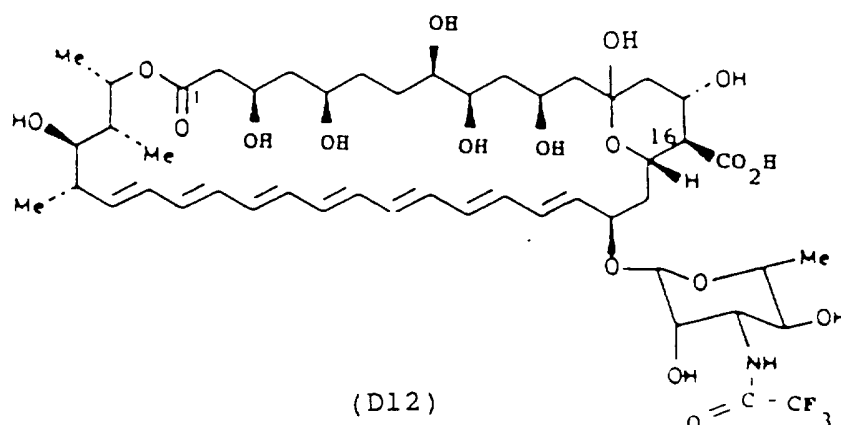
• IV "nu" máx (película fina):

: 3600-3300 (amplo., fraco),
3440, 2950, 2902, 2870, 1726, 1668, 1505, 1455, 1408,
1372, 1302, 1233, 1187, 1161, 1073, 1000, 898, 857,
833, 805, 732, 720, 667cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa⁺ 2163. Calculada para C₁₁₆H₂₀₉NO₁₇Si₉Na⁺, 2163.

Descrição 12

N-Trifluoroacetilanfotericina B (D12)



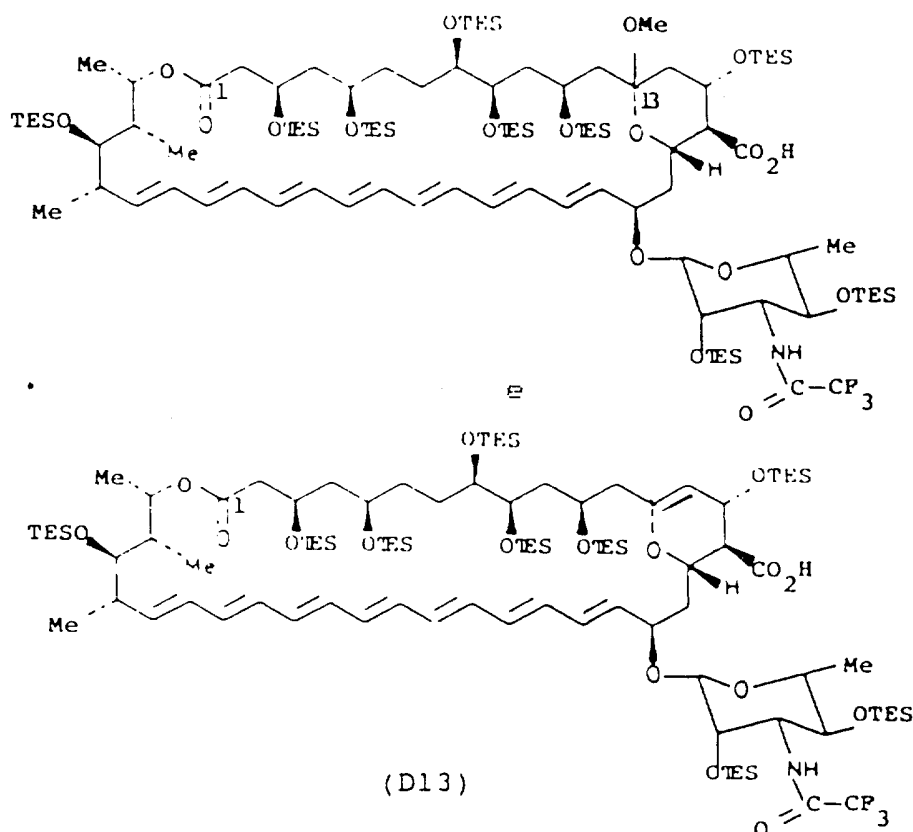
Uma mistura de anfotericina B (2,20 g, 2,38 mmoles), trifluoroacetato de etilo (0,51 g, 0,43 ml, 3,57 mmoles) e diisopropiletilamina (0,46 g, 0,62 ml, 3,57 mmoles) em dimetilformamida seca (100 ml)/metanol (10 ml) foi agitada à temperatura ambiente sob azoto. Depois de se agitar durante a noite, a mistura foi deitada em éter dietílico (4 l) com ácido acético glacial (cerca de 1 ml). O sólido precipitado foi recolhido por filtração, foi lavado com éter dietílico e acetato de etilo, e foi seco para produzir o composto do título (D12) sob a forma de um pó castanho.

CLAR: Coluna de fase invertida ODS 5μ 250 x 4,6 mm; eluente 78% de metanol - 22% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção: 7,9 minutos.

6H 270MHz(d₄- metanol/d₅-piridina 1:1) 6,75-6,23(13H series de m), 5,75-5,40(2H, m, particularm/dissimulado por picos de solvente 5,0-4,60(5H, series de m), 4,49(1H, m), 4,37(1H, dd, J 3,0, 10,5Hz), 4,27(1H, d, J 3,0Hz), 4,05-3,80(3H, m), 3,57(1H, m), 3,45-3,30(2H, m), 2,70-2,30(6H, series de m), 2,28-1,30(13H, series de m), 1,43(3H, d, J 6,3Hz), 1,36(3H, d, J 6,6Hz), 1,25(3H, d, J 6,3Hz), 1,18(3H, d, J 7,2Hz), ppm.
IR ν_{max} (disco KBr) : 3400 (amplo), 2920, 1720, 1552, 1379, 1323, 1172, 1063, 1010, 883, 847, 795cm⁻¹.

Descrição 13

N-Trifluoroacetil-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-tri-etilsililanfotericina B e N-Trifluoroacetil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B (D13)



N-Trifluoroacetil-anfotericina B (D12) (1,99 g, 1,96 mmoles) e Ácido d-10-canforsulfônico (180 mg, 0,77 mmole) foram agitados em tetraidrofurano seco (10 ml)/metanol (60 ml) à temperatura ambiente sob azoto. Ao fim de 15 minutos, adicionou-se trietilamina (118 mg, 0,16 ml, 1,16 mmoles), a solução foi concentrada para cerca de 10 ml e foi adicionada a dietiléter (2 l). O produto precipitado foi recolhido por filtração, foi lavado com éter dietílico e acetato de etilo e foi seco para proporcionar N-trifluoroacetil-13-O-metilanfotericina B sob a forma de um pó amarelo.

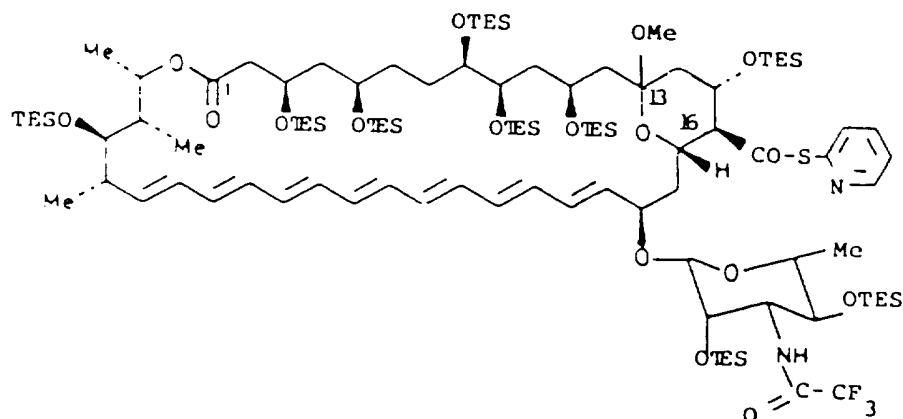
CLAR: As mesmas condições que na Descrição 12; tempo de retenção 5,1 minutos.

O pó amarelo foi suspenso em diclorometano seco (60 ml) a 0°C sob azoto e adicionou-se por meio de uma seringa 2,6-lutidina (2,51 g, 2,72 ml, 23,40 mmoles), seguida por trifluorometanosulfonato de trietilsililo (4,77 g, 4,08 ml, 18,00 mmoles). Depois de se ter agitado a 0°C durante 30 minutos, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em *n*-hexano, foi filtrado e o filtrado foi reconcentrado. A purificação por cromatografia de coluna sobre sílica gel eluindo-se com *n*-hexano/acetato de etilo produziu os dois produtos mais importantes.

- a) derivado de 13-O-metilo Rf 0,33 (sílica)-acetato de etilo a 10% em *n*-hexano.
- b) derivado de 13,14-anidro Rf 0,23 (sílica)-acetato de etilo a 10% em *n*-hexano.

Descrição 14

(2-Piridiltio)éster de N-trifluoroacetil-13-O-metil-3,5,8,9,11,-
15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B (D14)



(D14)

A amostra em bruto de N-trifluoroacetil-13-O-metil-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B (1,16 g) preparada na Descrição 13 foi tratada da mesma forma que na Descrição 7 com trietilamina (64 mg, 0,09 ml, 0,63 mmole) e cloroformato de 2-tiopiridilo (148 mg, 4,20 ml de uma solução de 35 mg/ml em diclorometano, 0,86 mmole) em éter dietílico (20 ml). O tratamento e purificação produziu o composto do título (D14) sob a forma de uma espuma amarela.

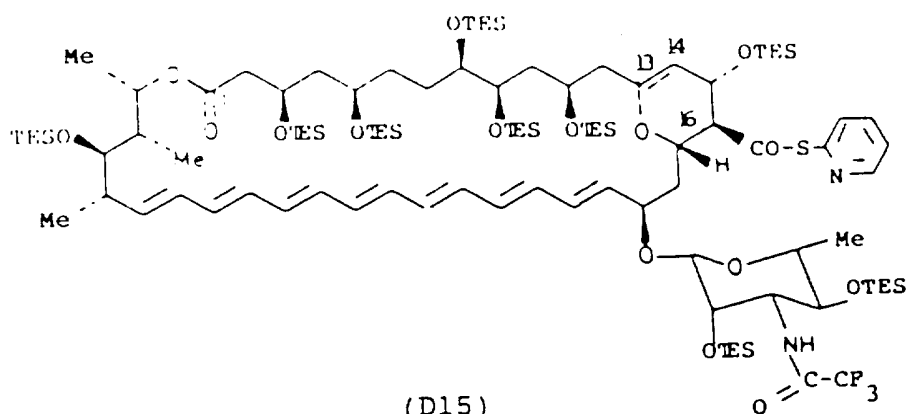
Rf 0,44 (sílica), acetato de etilo a 10% em η -hexano.

δ H 400 MHz ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : 8,73(1H, dd, J 1,0, 4,8Hz),
 7,93(1H, dt, J 1,9, 7,8Hz), 7,73(1H, d, J 7,9Hz),
 7,41(1H, ddd, J 1,0, 4,8, 7,6Hz), 7,21(1H, d, J 9,1Hz
 parcialm/transform.dentério 6,61-6,11(12H, series de m),
 5,98(1H dd, J 5,6, 15,7Hz), 5,50(1H, dd, J 9,6,
 14,7Hz), 4,82(1H, m), 4,71(1H, s), 4,69(1H, m),
 4,48(1H, dt, J 4,5, 10,3Hz), 4,24(1H, m), 4,14(1H, m),
 4,10-3,95(4H, m), 3,84(1H, dd, J 2,6, 8,8Hz),
 3,73-3,60(3H, m, incluindo t, J 8,8Hz at 3,67),
 3,52(1H, dq, J 6,3, 8,5Hz), 3,15(3H, s), 2,73(1H, t, J
 10,1Hz), 2,57(2H, d, J 6,8Hz), 2,44(1H, m), 2,32(1H,
 dd, J 6,8, 14,9Hz), 2,17-1,60(13H, séries de m),
 1,51(1H, m), 1,28(3H, d, J 6,2Hz), 1,18(3H, d, J
 6,0Hz), 1,14-0,90(87H, séries de m), 0,83-0,57(54H,
 series de m)ppm.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa^+
 2175 $\pm$ 1, calculada para $\text{C}_{109}\text{H}_{203}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{Si}_7\text{SF}_3\text{Na}^+$, 2176.

Descrição 15

(2-Piridiltio)éster de N-trifluoroacetil-13-O-metil-3,5,8,9,11,-
15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B (D15)



A amostra em bruto de N-trifluoroacetil-3,5,8,9,11,15,-
 35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B (697 mg)
 da Descrição 13 foi agitada a 0°C em éter dietílico seco (10 ml)
 e foi tratada com trietilamina (33 mg, 0,05 ml, 0,33 mmole),
 seguida por cloroformato de 2-tiopiridilo (77 mg, 2,2 ml de uma
 solução de 35 mg/ml em diclorometano, 0,44 mmole). Depois de se
 ter agitado a 0°C durante 30 minutos, adicionaram-se mais 0,01 ml
 de trietilamina e 0,5 ml de uma solução de cloroformato de
 2-tiopiridilo e a agitação continuou durante mais 20 minutos. A
 mistura foi diluída com éter dietílico (100 ml), foi seca sobre
 sulfato de magnésio anidro, foi filtrada e evaporada. A purifi-
 cação por cromatografia "flash" sobre sílica gel (eluição com
 acetato de etilo a 10% em n-hexano produziu o composto do título
 (D15) sob a forma de um sólido vítreo amarelo.

 - 49 -

Rf: 0,89 (sílica), acetato de etilo a 15% em η -hexano.

^1H 400MHz ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : 8,72(1H, ddd, J 0,9, 1,9, 4,8Hz), 7,94(1H, dt, J 1,9, 7,7Hz), 7,74(1H, dt, J 0,9, 7,9Hz), 7,45(1H ddd, J 1,1, 4,8, 7,6Hz), 7,27(1H, d, J 9,2Hz), 6,55-6,11(12H, series de m), 6,01(1H, dd, J 6,4, 15,4Hz), 5,56(1H, dd, J 9,3, 14,8Hz), 4,83-4,79(1H, m), 4,82(1H, s), 4,77(1H, m), 4,69(1H, m), 4,67(1H, s), 4,35(1H, ddd, J 2,1, 7,4, 10,5Hz), 4,22(1H, m), 4,16-4,06(2H, m), 4,05(1H, d, J 3,1Hz), 4,01(1H, m), 3,85(1H, dd, J 2,8, 8,6Hz), 3,80-3,69(2H, m), 3,68(1H, t, J 8,9Hz), 3,52(1H, dq, J 6,2, 8,6Hz), 3,04(1H, dd, J 8,6, 10,7Hz), 2,58(1H, dd, J 5,8, 17,1Hz, A de ABX sistema), 2,52(1H, dd, J 7, 17,1Hz, B de ABX sistema), 2,43(1H, m), 2,40-2,30(2H, m), 2,12-1,88(5H, series of m), 1,82-1,58(5H, series de m), 1,51(1H, m), 1,27(3H, d, J 6,2Hz), 1,19(3H, d, J 6,0Hz), 1,10-0,92(87H, series de m), 0,77-0,59(54H, series de m)ppm.

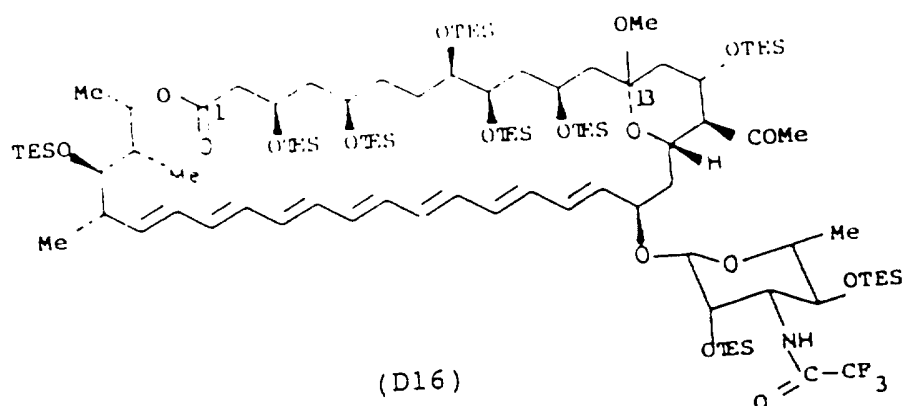
IV "nu" $_{\text{máx}}$ (película fina):

: 3430, 2958, 2916, 2880,
1737, 1703, 1676, 1574, 1529, 1460, 1416, 1379, 1298,
1239, 1187, 1167, 1075, 1006, 837, 740, 672 cm^{-1} .

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada 2144,
calculada para $\text{C}_{108}\text{H}_{199}\text{NO}_{16}\text{Si}_9\text{SF}_3\text{Na}^+$, 2144.

Descrição 16

N-Trifluoroacetil-16-acetil-16-descarbóxi-13-O-metil-3,5,8,9,11,-
15,35,2',4'-nona-O-trietilsililanfotericina B (D16)



O éster de piridiltio da Descrição 14 (626 mg, 0,31 mmole) foi agitado a 0°C em tetraidrofurano (10 ml) sob azoto e foi tratado com brometo de metilmagnésio (1,02 ml de uma solução 3M em éter dietílico, 3,1 mmoles). Adicionaram-se mais porções de brometo de metilmagnésio (2,0 ml em 3 porções durante 4,5 horas) e a mistura foi deixada atingir a temperatura ao fim de 3 horas. Ao fim de 5 horas no total, adicionou-se água e o produto foi extraído em éter dietílico. Os extractos combinados foram lavados com salmoura saturada, foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e concentrados. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel (elução com diclorometano) produziu o composto do título (D16) sob a forma de um vidro amarelo.

Rf: 0,46 (sílica), diclorometano.

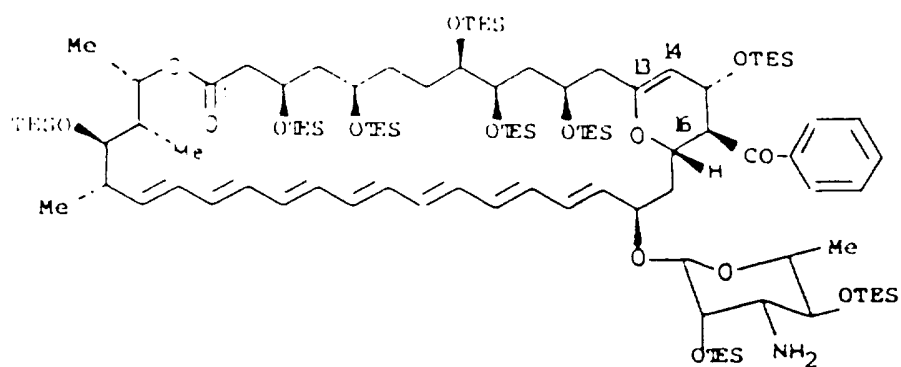
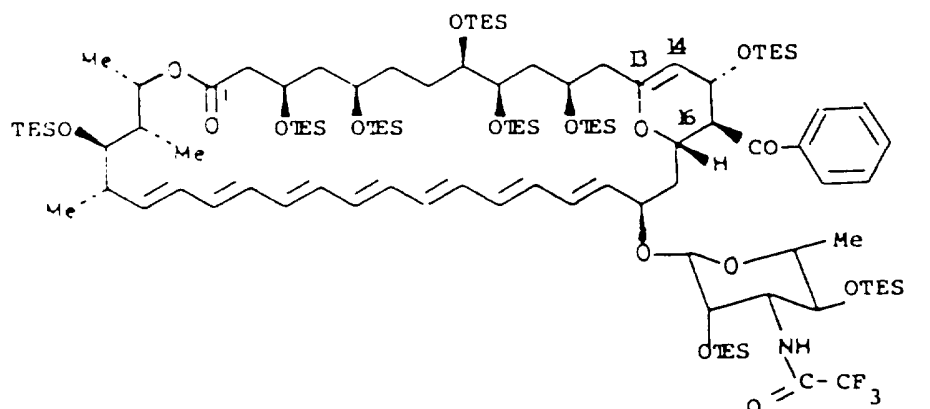
δ H 270MHz ((CD₃)₂CO) : 7,40(1H, d, J 9,1Hz),
 6,50-6,07(12H, series de m), 6,0(1H, dd, J 6,3,
 15,4Hz), 5,51(1H, dd, J 9, 14Hz), 4,76-4,55(3H, m,
 incluyendo s de 4,63), 4,33(1H, dt, J 5, 9,6Hz),
 4,25(1H, m), 4,20-3,90(5H, series de m), 3,85(1H, dd, J
 3, 8,8Hz), 3,80-3,57(3H, m), 3,42(1H, dq, J 6,3,
 8,2Hz), 3,14(3H, s), 2,69(1H, t, J 10,3Hz), 2,58(2H, d,
 J 6,3Hz), 2,44(1H, m), 2,28(3H, s), 2,14-1,44(15H,
 series de m), 1,28(3H, d, J 6,1Hz), 1,18(3H, d, J
 6,1Hz), 1,14-0,86(87H, series de m), 0,83-0,50(54H,
 series de m)ppm.

IV "niu"_{máx} (película fina):

: 3425, 2955, 2910, 2875,
 1731, 1710, 1525, 1458, 1411, 1376, 1305, 1236, 1160,
 1080 (broad), 1001, 899, 864, 830, 739, 669cm⁻¹.

Descrição 17

N-Trifluoroacetil-16-benzoil-16-descarbóxi-3,5,8,9,11,15,35,2',-
4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B e 16-benzoil-
-16-descarbóxi-3,5,8,9,11,15,35,2',- 4'-nona-O-trietilsilil-
-13,14-anidroanfotericina B (D17)



(D17)

O éster de piridiltio da Descrição 15 (529 mg, 0,24 mmole) foi agitado a 0°C em tetraidrofurano (15 ml) sob azoto e adicionou-se por meio de uma seringa brometo de fenilmagnésio (0,79 ml de uma solução 3M em éter dietílico, 2,35 mmoles). Ao fim de 30 minutos, adicionaram-se mais 0,30 ml de uma solução de brometo de fenilmagnésio e a gitação foi mantida durante mais 1,5 horas. Adicionou-se água e o produto foi extraído em éter dietílico. Os extractos combinados foram lavados com salmoura

saturada, foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e evaporados. A purificação por cromatografia de coluna sobre sílica gel (elução com misturas de n-hexano/acetato de etilo e de n-hexano/diclorometano) produziu os dois produtos mais importantes.

O derivado de N-trifluoroacetilo menos polar apresenta: Rf: 0,71 (sílica), acetato de etilo a 15% em n-hexano.

6H 270MHz ((CD₃)₂CO) : 8,12(2H, d, J 6,9Hz), 7,74-7,56(3H, m), 7,37(1H, d, J 9,1Hz), 6,57-6,09(12H, series de m), 5,90(1H, dd, J 6,6, 15,7Hz), 5,54(1H, dd, J 10, 15Hz), 4,83(1H, d, J 8,2Hz), 4,73(1H, s), 4,66(1H, m), 4,42(2H, m), 4,27-3,66(10H, series de m), 3,60(1H, t, J 8,9Hz), 3,05(1H, m), 2,66-2,33(4H, m), 2,10-1,43(12H, series de m), 1,23-0,88(93H, series de m), 0,88-0,35(54H, series de m)ppm.

IV "niu"_{máx} (película fina):

: 3435, 2957, 2915, 2880, 1737, 1675, 1599, 1528, 1460, 1413, 1379, 1296, 1240, 1166, 1071, 1005, 897, 857, 839, 730, 670cm⁻¹

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa⁺ 2112±1, calculada para C₁₀₉H₂₀₀NO₁₆Si₉F₃Na⁺, 2111.

O derivado de amino livre mais polar apresenta: Rf: 0,38 (sílica), acetato de etilo a 15% em n-hexano.

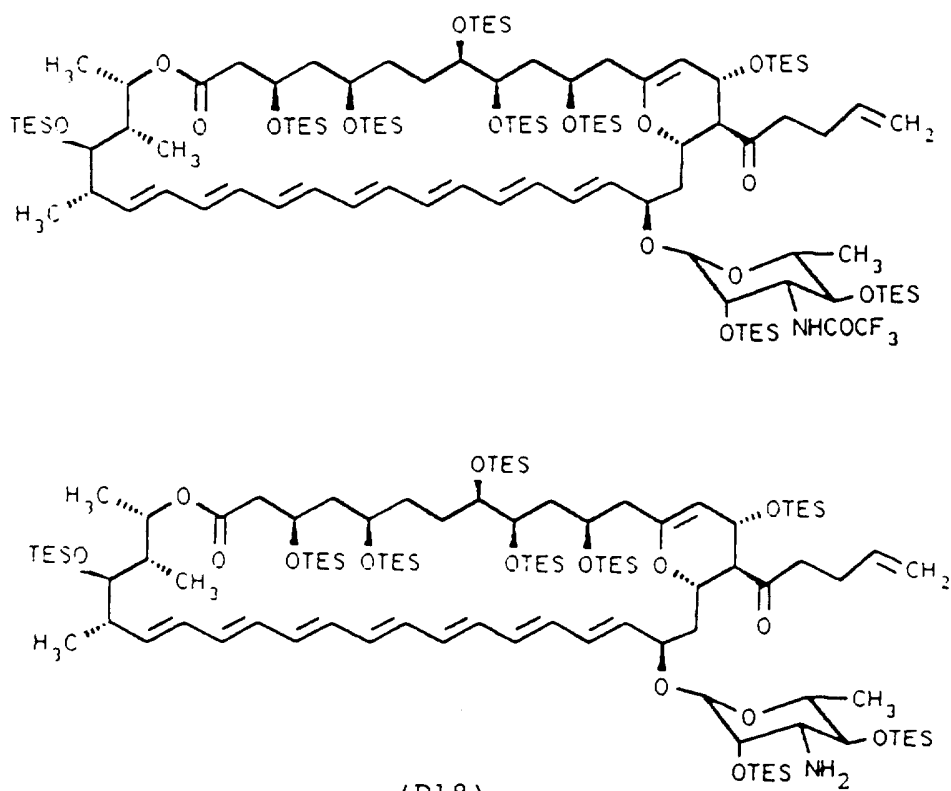
IV "niu" máx (película fina):

: 2955, 2910, 2879, 1736, 1672,
1599, 1580, 1460, 1412, 1366, 1306, 1237, 1205, 1165,
1075 (amplo), 1003, 974, 862, 837, 809, 736cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NDBA/Na) massa observada MNa⁺
2016±1, calculada para C₁₀₇H₂₀₁NO₁₅Si₉Na⁺, 2015,3.

Descrição 18

N-Trifluoroacetil-16-(3-butenilcarbonil)-16-descarbóxi-3,5,8,9,-
11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B e
16-(3-butenilcarbonil-16-descarbóxi-3,5,8,9,11,15,35,2',4'-nona-
-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B (D18)



O piridiltioéster da Descrição 15 (344 mg, 0,162 mmole) foi agitado a 0°C em tetraidrofurano seco (10 ml) sob azoto e foi tratado com brometo de vinilmagnésio (2,43 ml de uma solução 1M em tetraidrofurano, 2,43 mmoles). Depois de se ter agitado a 0°C durante 0,5 horas, adicionou-se uma solução saturada de cloreto de amónio e o produto foi extraído em éter dietílico. Os extrac-
 tos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio

anidro, foram filtrados e o filtrado foi evaporado. A purificação por meio de cromatografia de coluna sobre sílica gel (elução com misturas de n-hexano/acetato de etilo) produziu os dois produtos mais importantes.

O derivado de N-trifluoroacetilo menos polar apresenta: Rf: 0,82 (sílica, acetato de etilo a 10% em n-hexano).

δ H 400 MHz ((CD₃)₂CO): incluindo 7,34 (1H,d,J 8,9 Hz), 5,8 (1H,m), 5,08 (1H,m), 4,98 (1H,m), 4,64 (2H,s) 2,94 (1H, dd, J 10,5 de 8,9 Hz) ppm.

IV "nu" máx (película fina):

: 3425 (fraco), 2955, 2910, 2875, 1735, 1710, 1670, 1525, 1460, 1410, 1375, 1240, 1165, 1075, 1005, 740, 725 cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa⁺ 2089, calculada para C₁₀₇H₂₀₂NO₁₆Si₉F₃Na⁺, 2089.

O derivado de amino mais polar apresenta: Rf: 0,36 (sílica, acetato de etilo a 10% em n-hexano).

δ H 400 MHz ((CD₃)₂CO): includes 5,87 (1H,m), 5,08 (1H,dd,J 17,1 e 1.6 Hz), 4,98 (1H,d,J 10,2 Hz), 4,63 (1H,s), 2,94 (1H,dd,J 10,7 e 8,5 Hz) ppm.

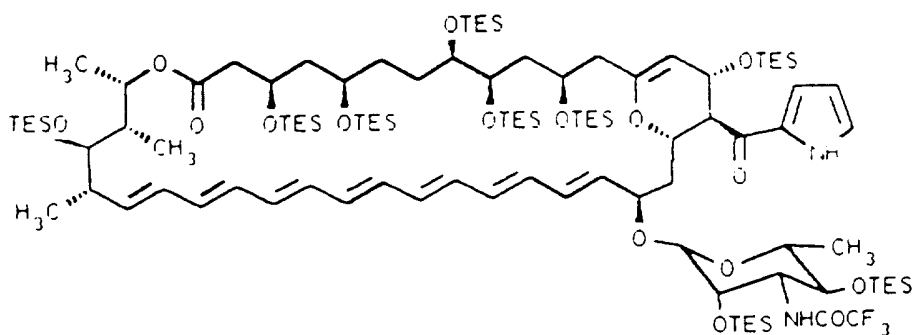
IV "niu" _{máx} (película fina):

: 2950, 2905, 2875, 1735, 1710,
1670, 1640, 1460, 1410, 1375, 1240, 1190, 1165, 1090,
1005, 865, 740 cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa⁺ 1993, calculada para C₁₀₅H₂₀₃NO₁₅Si₉Na⁺, 1993.

Descrição 19

N-Trifluoroacetil-16-descarbóxi-16-(2-pirrolilcarbonil)-3,5,8,9,-
11,15,35,2',4'-nona-O-trietilsilil-13,14-anidroanfotericina B
(D19)



(D19)

Uma solução de brometo de pirrolilmagnésio foi preparada por tratamento do pirrolo (354 mg, 0,366 ml, 5,30 mmoles) em tetraidrofurano seco (5 ml) com brometo de etilmagnésio (1,26 ml de uma solução 3M em éter dietílico, 3,77 mmoles) a 0°C sob azoto. Após agitação durante 5 minutos a 0°C e 5 minutos à



- 58 -

temperatura ambiente, esta solução de Grignard foi adicionada por meio de uma cânula a uma solução arrefecida com gelo do éster de piridiltio da Descrição 15 (402 mg, 0,189 mmoles) em tetraidrofurano seco (5 ml). A mistura foi agitada durante 20 minutos a 0°C e depois foi temperada com uma solução saturada de cloreto de amônio. O produto foi extraído em éter dietílico e os extractos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio anidro, foram filtrados e o filtrado foi evaporado in vacuo. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel (elução com misturas de acetato de etilo/ η -hexano) produziu o composto do título (D19) sob a forma de vidro amarelo.

δ H 400MHz ((CD₃)₂CO): inclui 11,09 (1H,s), 7,46 (1H,d,J 9,2Hz), 7,24 (1H,m), 7,08 (1H,m), 4,68 (1H,s), 3,45 (1H,dd,J 11,0 e 8,6Hz) ppm.

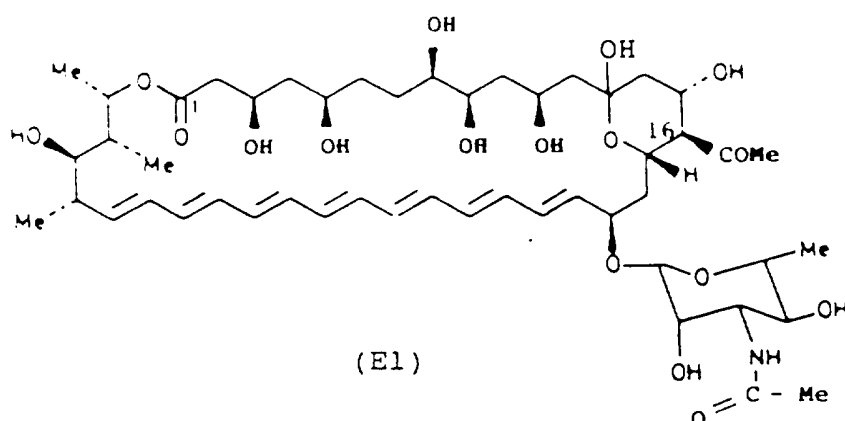
IV "nu"_{máx} (película fina):

: 3415, 3370, 2950, 2905, 2875,
1730, 1670, 1620, 1525, 1455, 1410, 1375, 1235, 1165,
1070, 1005, 870, 835, 760 cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa⁺ 2100,4, calculada para C₁₀₇H₁₉₉N₂O₁₆Si₉F₃Na⁺, 2100,3.

Exemplo 1

N-Acetil-16-acetil-16-descarboxianfotericina E (E1)



A mistura de produtos da Descrição 3 foi agitada à temperatura ambiente em tetraidrofurano seco (3 ml) numa garrafa de plástico e foi tratada com uma solução de fluoreto de hidrogénio-piridina (7,00 ml) de uma solução de 1,93 g de fluoreto de hidrogénio.piridina e 12,80 ml de piridina em 50 ml de tetraidrofurano). Após agitação durante 18 horas, a mistura foi deitada em éter dietílico (600 ml) e o sólido precipitado foi recolhido por centrifugação. A lavagem do sólido com éter dietílico e a sua secagem proporcionou um pó amarelo.

O pó foi agitado em tetraidrofurano (10 ml)/água (3 ml) com ácido canforsulfónico (0,014 g). Ao fim de 1,25 horas, adicionaram-se mais 0,012 g de ácido canforsulfónico e a mistura foi agitada durante mais 0,75 horas. Adicionou-se trietilamina (0,025 ml), o tetraidrofurano foi removido in vacuo e o produto sólido foi centrifugado a partir do resíduo aquoso. A secagem proporcionou um sólido que foi triturado com acetato de etilo para proporcionar um pó amarelo pálido. A purificação por

cromatografia de coluna sobre sílica de fase invertida (elução com misturas de tetraidrofurano) proporcionou N-acetil-16-acetil-16-descarboxianfotericina B.

IV "niu" _{máx} (disco de KBr):

: 3400 (amplo), 2925, 1720, 1700, 1658, 1375, 1310, 1180, 1108, 1065, 1010, 850 cm^{-1} .

^1H (270MHz), (d-6 DMSO): 7,63(1H,d,J 8,3Hz), 6,55-6,05 (12H, series de m), 5,95(1H,dd,J 15 e 9Hz), 5,94(1H,s, permutas com D_2O), 5,43(1H,dd,J 13,5 e 9,9Hz), 5,39(1H,s, permutas com D_2O), 5,22(1H,m), 4,90(1H,d,J 6Hz, permutas com D_2O), 4,85-4,55(6H, multiplete, permutas com D_2O), 4,45(1H,d,J 6Hz, permutas com D_2O), 4,32(1H,s), 4,35-4,17(3H,m), 4,09-3,88(2H,m), 3,70-3,35(4H,m), 3,20-2,95(4H,m), 2,50-2,05(5H, series de m), 2,15(3H,s), 1,95-1,0(14H, series de m), 1,85(3H,s), 1,14(3H,d,J 5,2Hz), 1,11(3H,d,J 6,6Hz), 1,03(3H,d,J 6,3Hz), 0,91(3H,d, 6,9Hz)ppm.

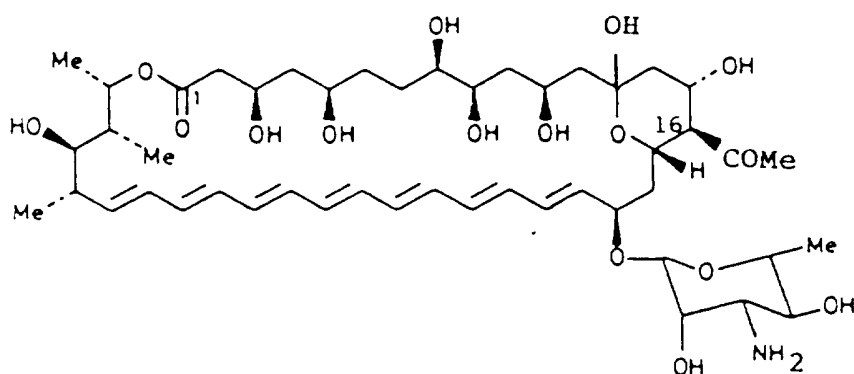
Espectro de massa: FAB (matriz 3-NOBA/Na) massa observada MNa^+ 986, calculada para $\text{C}_{50}\text{H}_{77}\text{NO}_{17} \text{Na}^+$, 986,5.

CLAR: Coluna de fase invertida ODS 5μ 250 x 4,6 mm; eluente 78% de metanol - 22% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 8,0 minutos.

~~_____~~

Exemplo 2

16-Acetil-16-descarboxianfotericina B (E2)



(E2)

O produto da Descrição 16 (154 mg, 0,08 mmole) e uma solução de fluoreto de hidrogénio-piridina (4,6 ml de uma solução de 2,36 g de fluoreto de hidrogénio-piridina e 14 ml de piridina diluídos para 63 ml em tetraidrofurano) foram agitados durante a noite à temperatura ambiente numa garrafa de plástico. A mistura foi deitada em éter dietílico/n-hexano (600 ml, 1:1) e o precipitado sólido foi recolhido por centrifugação, foi lavado com éter dietílico, foi dissolvido em metanol, foi filtrado e concentrado para proporcionar um pó amarelo. O pó amarelo foi agitado à temperatura ambiente em tetraidrofurano (3 ml)/água (1 ml) contendo ácido d-10-canforsulfónico (8,0 mg). Após agitação durante 3,5 horas, adicionou-se trietilamina (0,01 ml) e a mistura foi concentrada no evaporador rotativo. O produto em bruto foi triturado com éter dietílico/acetato de etilo para proporcionar o derivado de N-trifluoroacetilo do composto do título sob a forma de um pó amarelo. Este produto foi agitado à temperatura ambiente em tetraidrofurano (5 ml), metanol (2,5 ml) e uma solução de amónia 0,880 (2,5 ml). Ao fim de 4 horas,

adicionaram-se mais 3 ml de uma solução de amónia 0,880 e a agitação foi mantida durante mais 4 horas, antes de se armazenar a mistura num congelador durante a noite. Adicionaram-se mais 2 ml de uma solução de amónia 0,880 e a agitação foi mantida durante mais 6 horas à temperatura ambiente. Os solventes foram removidos no evaporador rotativo e o resíduo foi lavado com éter dietílico e seco para proporcionar um sólido castanho. A purificação por cromatografia sobre sílica gel (elução com a fase inferior das misturas de clorofórmio/metanol/amónia 0,880) proporcionou o composto do título sob a forma de um pó amarelo.

Rf 0,32 (sílica), 2:1:1 clorofórmio:metanol:amónia 0,880 (fase inferior).

^1H 400MHz (d_4 -metanol/ d_5 -piridina 1:1) :
6,69-6,27(13H, series de m), 5,65(1H, m), 5,50(1H, dd, J 10,2, 14,8Hz), 4,85(1H, m), 4,71(1H, s),
4,70-4,62(2H, m), 4,58(1H, ddd, J 4,6, 10,5, 10,8Hz),
4,46(1H, tt, J 3,0, 9,7Hz), 4,23(1H, d, J 3,0Hz),
3,97(1H, m), 3,87(1H, m), 3,52(1H, t, J 9,3Hz),
3,49-3,36(3H, m), 2,92(1H, dd, J 3,1, 9,4Hz), 2,73(1H, t, J 10,5Hz), 2,57(1H, m), 2,50(1H, dd, J 9,7, 16,8Hz),
2,40(3H, s), 2,36(1H, dd, J 2,8, 16,8Hz), 2,30(1H, J 4,6, 12,1Hz), 2,20-2,08(2H, m), 2,06-1,97(2H, m),
1,90-1,48(10H, series de m), 1,44(3H, d, J 5,9Hz),
1,36(3H, d, J 6,4Hz), 1,25(3H, d, J 6,4Hz), 1,17(3H, d, J 7,2Hz)ppm.



- 63 -

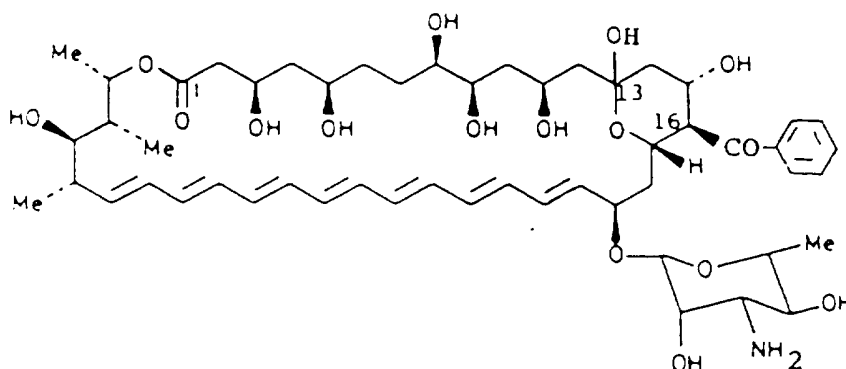
IV "nu" máx (disco de KBr):

: 3380 (amplo), 2920, 1700
(bassa a 1721), 1445, 1366, 1307, 1268, 1180, 1104,
1063, 1009, 883, 845cm⁻¹.

Espectro de massa: FAB (Matriz de tioglicerol) massa observada
MH⁺ 922, calculada para C₄₈H₇₅NO₁₆H⁺, 922,5.

Exemplo 3

16-Benzóilo-16-decarboxianfotericina B (E3)



(E3)

O produto de amino livre da Descrição 17 (248 mg, 0,12 mmole) e uma solução de fluoreto de hidrogénio-piridina (7,60 ml de uma solução de 2,36 g de fluoreto de hidrogénio-piridina e 14 ml de piridina diluídos para 63 ml em tetraidrofurano) foram agitados durante 18 horas à temperatura ambiente numa garrafa de plástico. A mistura foi deitada em dietiléter/p-hexano (1:1) e o produto sólido foi recolhido por centrifugação, foi lavado com éter dietílico, foi dissolvido em metanol, foi filtrado e concentrado para proporcionar o derivado 13,14-anidro do composto do título.

Este produto foi agitado à temperatura ambiente em tetraidrofurano (6 ml)/água (2 ml) contendo ácido d-10-canforsulfônico (48 mg). Adicionaram-se 4 porções de ácido d-10-canforsulfônico ao fim de 2 horas (20 mg) e 3 horas (32 mg) de reação. Depois de se ter agitado durante um total de 5,5 horas, adicionou-se trietilamina (0,08 ml) e a mistura foi concentrada num evaporador rotativo. O produto em bruto foi dissolvido num volume mínimo de tetraidrofurano/sulfóxido de dimetilo e foi adicionado a éter dietílico (400 ml). O sólido precipitado foi recolhido por centrifugação e foi cromatografado sobre sílica gel, eluindo-se com 5:2:2 de clorofórmio:metanol:amónia 0,880 (fase inferior) para proporcionar o composto do título sob a forma de um sólido amarelo.

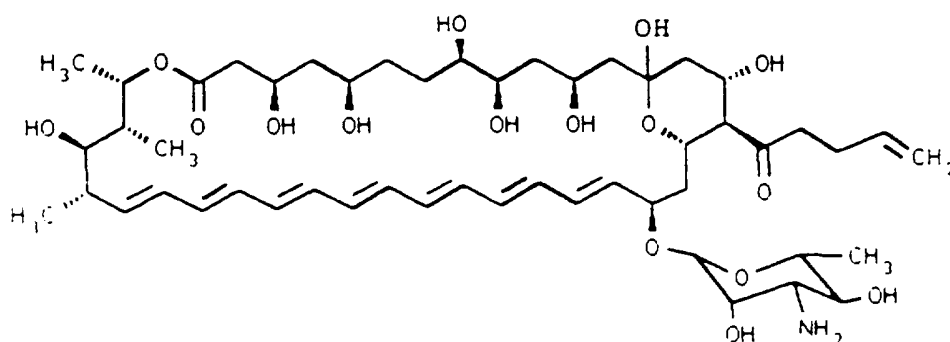
Rf: 0,32 (sílica), solução de 2:1:1 de clorofórmio:metanol:amónia 0,880 (fase inferior).

δ H 400MHz (d4-mettanol/d5-piridina 1:1) : 8,30(2H m),
 7,64(1H, m), 7,56(2H, m), 6,69-6,24(13H, series de m),
 5,66(1H, m), 5,50(1H, dd, J 14,9, 10,2Hz), 5,01(1H, t,
 J 4,7, 9,5Hz), 4,87(1H, ddd, J 4,7, 10,1, 11,1Hz), 4,70
 (1H, m), 4,61(1H, m), 4,47(1H, m), 4,46(1H, s),
 4,31(1H, d, J 3,1Hz), 3,98(1H, m), 3,89(1H, m),
 3,80(1H, t, J 10,1Hz), 3,55(1H, J 9,5Hz), 3,47(1H, m),
 3,38(1H, dd, J 2, 9,5Hz), 3,25(1H, dq, J 6,1, 9,1Hz),
 2,97(1H, dd, J 3,0, 9,8Hz), 2,58(1H, m), 2,50(1H, dd de
 sistema ABX J 9,6, 16,8Hz), 2,40(1H, dd, J 4,7, 11,7Hz),
 2,36(1H, dd de sistema ABX J 2,8, 16,8Hz), 2,22-1,97(4H,
 series de m), 1,92(1H, dd, J 11,0, 13,9Hz),
 1,86-1,47(9H, series de m), 1,37(3H, d, J 6,1Hz),
 1,36(3H, d, J 6,4Hz), 1,25(3H, d, J 6,4Hz), 1,17(3H, d,
 J 7,2Hz)ppm.

Espectro de massa: FAB (Matriz de tioglicerol) massa observada
 MH^+ 984, calculada para $C_{53}H_{77}NO_{16}H^+$, 984,5.

Exemplo 4

16-(3-Butenilcarbonil)-16-decarboxianfotericina B (E4)



(E4)

O produto de amino livre da Descrição 18 (109 mg, 0,055 mmole) e uma solução de fluoreto de hidrogénio-piridina (2,2 ml de uma solução de 11,4 g de fluoreto de hidrogénio-piridina e 80 ml de piridina diluídos para 200 ml em tetraidrofurano) foram agitados durante 18 horas à temperatura ambiente sob azoto numa garrafa de plástico. A mistura foi deitada em dietiléter/*n*-hexano (200 ml, 1:1) e o produto precipitado foi recolhido por filtração, foi lavado com éter dietílico, foi dissolvido em metanol e a solução foi concentrada in vacuo. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel, eluindo-se com uma solução de 5:2:2 de clorofórmio:metanol:amónia 0,880 (fase inferior) proporcionou um pó amarelo.

Este produto foi agitado em tetraidrofurano (3 ml)/água (1 ml) à temperatura ambiente e foi tratado com *p*-toluenossulfonato de piridínio (30 mg). Ao fim de 2 horas, adicionou-se mais *p*-toluenossulfonato de piridínio (23 mg) e a mistura foi agitada

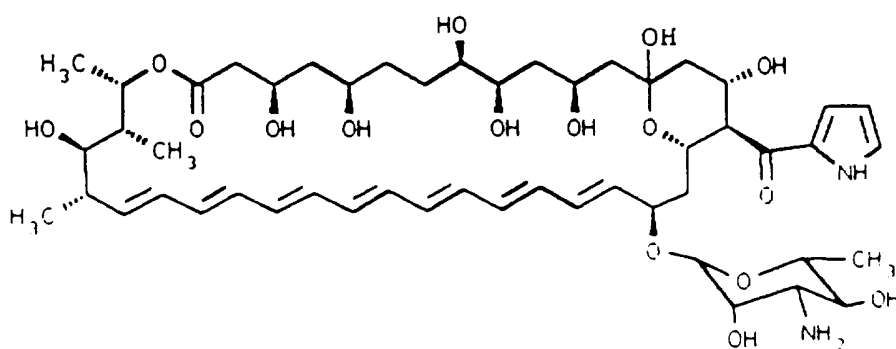
à temperatura ambiente durante 6 horas, foi armazenada no congelador durante a noite e depois foi agitada à temperatura ambiente durante mais 8 horas. Adicionaram-se mais algumas gotas de trietilamina e o tetraidrofurano foi removido no evaporador rotativo. O resíduo foi adicionado a água (200 ml) e o produto precipitado foi recolhido por filtração, foi lavado com água e foi seco in vacuo. A purificação por cromatografia "flash" sobre sílica gel, eluindo-se com uma solução de 5:2:2 de clorofórmio:metanol:amónia 0,880 (fase inferior) proporcionou o composto do título (E4) sob a forma de um pó amarelo.

δ H 400MHz (d_4 - metanol/ d_5 -piridina 1:1): inclui
5,93 (1H,m), 5,12 (1H,m), 5,02 (1H,m) e 2,75 (1H,t,J
10,4Hz) ppm.

Espectro de massa: FAB (Tiodietanol/Na) massa observada MNa^+ 984,
calculada para $C_{51}H_{79}NO_{16}Na^+$, 984,5.

Exemplo 5

16-Decarboxi-16-(2-pirrolilcarbonil)anfotericina B (E5)



(E5)

O produto da Descrição 19 (320 mg, 0,154 mmole) e fluoreto de hidrogénio-piridina (5,7 ml de uma solução de 15,5 g de fluoreto de hidrogénio-piridina e 92 ml de piridina diluída para 250 ml com tetraidrofurano) foram agitados em tetraidrofurano seco (5 ml) à temperatura ambiente sob azoto numa garrafa de plástico. Ao fim de 18 horas, a mistura foi deitada em éter dietílico/n-hexano (400 ml, 1:1) e o produto precipitado foi recolhido por filtração e lavado com éter dietílico. O produto foi dissolvido em tetraidrofurano, foi filtrado através de uma coluna curta de sílica gel e o eluente foi concentrado in vacuo para proporcionar um pó amarelo. Este produto foi agitado à temperatura ambiente em tetraidrofurano (4 ml)/água (2 ml) com ácido canforsulfónico (15,6 mg). Ao fim de 0,25 horas, adicionou-se mais ácido canforsulfónico (19,0 mg) e a agitação foi mantida durante mais 3,25 horas. Adicionou-se trietilamina (23 mg, 0,031 ml) e o tetraidrofurano foi removido no evaporador rotativo. Adicionou-se o resíduo aquoso à água (400 ml) e o

produto precipitado foi recolhido por filtração, foi lavado com água e foi seco para produzir um pó amarelo/acastanhado.

Este produto foi agitado à temperatura ambiente em tetraidrofurano (5 ml), metanol (5 ml) e uma solução de amónia 0,880 (5 ml). Ao fim de 3 horas, a mistura foi armazenada num congelador durante a noite e depois foi agitada à temperatura ambiente durante mais 8 horas. Os solventes foram removidos no evaporador rotativo e o produto em bruto foi purificado por meio de uma combinação de cromatografia de coluna e CCF preparativa sobre sílica (elução com a fase inferior de misturas de cloro-fórmio/metanol/amónia 0,880) para se obter o composto do título (E5) sob a forma de um pó amarelo acastanhado.

"delta"¹H 400 MHz (d_4 -metanol/ d_5 -piridina 1:1); inclui 7,36 (1H,m,dissimulado parcialmente pelo solvente), 7,27 (1H,dd,J 2,4 e 1,3 Hz) ppm.

IV "niu"_{max} (disco de KBr):

: 3350 (amplo.), 2910, 1705, 1610, 1395, 1320, 1175, 1100, 1045, 1005, 880, 845, 810, 755 cm^{-1} .

Espectro de massa: FAB (Tiodietanol/Na) Massa observada MNa^+ 995, calculada para $C_{51}H_{76}N_2O_{16}Na^+$, 995,5.

UV (metanol) "lâmbda"max 406, 382, 363, 345 nm.

Valores CIM

Método

A Concentração Inibidora Mínima (CIM) foi determinada por diluição do composto de ensaio num meio de caldo num tabuleiro de microtitulação. Os organismos, que já tinham sido desenvolvidos previamente num meio de caldo, foram diluídos e adicionados a reservatórios, com o objectivo de se obter um inóculo final com aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colónia por reservatório. Os tabuleiros foram incubados a 37°C e a turvação de cada reservatório foi registada periodicamente. A CIM foi a menor concentração (em µg/ml) que impediu que se desse um crescimento significativo.

Resultados

Concentração Inibidora Mínima ($\mu\text{g/ml}$)

(determinada ao fim de 2 e 3 dias de incubação)

ORGANISMO*	DIA	EXEMPLO 2		EXEMPLO 3	
		YNB	SAB	YNB	SAB
Candida albicans 73/079	2	2	0,5	1	1
	3	2	0,5	4	1
Candida parapsilose 937 A	2	4	2	4	2
	3	4	4	8	4

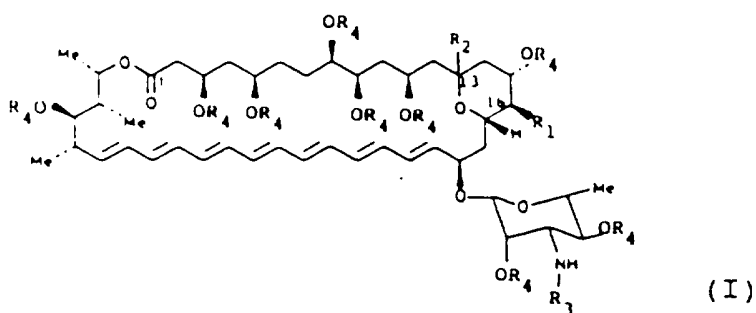
* Inóculo de 10^5 células/ml

YNB: Caldo à Base de Azoto de Levedura

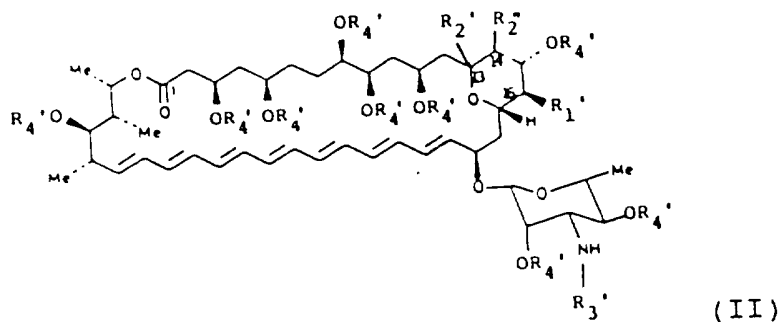
SAB: Caldo de Dextrose de Sabouraud.

REIVINDICAÇÕES

1a - Processo para a preparação de um composto de fórmula (I), ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável:

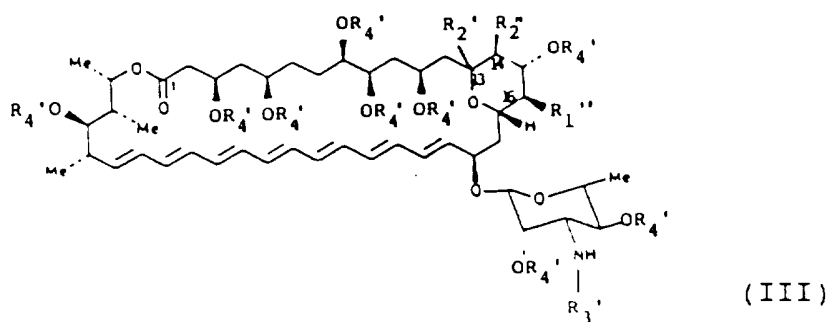


na qual R₁ é um grupo -X-Y, em que X é um grupo carbonilo e Y é hidrogénio, alquilo C₁₋₈, alquenilo C₂₋₈, ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído; R₂ é hidróxi ou alcóxi C₁₋₈; R₃ é hidrogénio ou um grupo de protecção de amina; e cada R₄ é hidrogénio, caracterizado por compreender a reacção de um composto de fórmula (II):



na qual R_1' é um derivado de ácido carboxílico activado; R_2' é alcóxi C_{1-8} e R_2'' é hidrogénio, ou R_2' e R_2'' em conjunto representam uma ligação; R_3' é um grupo de protecção de amina; e cada um de R_4' é um grupo de protecção sililo, com:

- (a) um reagente organometálico Y-M em que Y é alquilo C_{1-8} , alquenilo C_{2-8} ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído e M é um resíduo metálico, para produzir um composto de fórmula (III):



na qual R_1'' é grupo -X-Y, em que X é um grupo carbonilo, e Y é alquilo C_{1-8} , alquenilo C_{2-8} , ou arilo ou heteroarilo facultativamente substituído; e R_2' , R_2'' , R_3' e R_4' são como definidos para a fórmula (II); ou

- (b) um agente de redução, para produzir um composto de fórmula (III), em que R_1'' é $-CH_2OH$; e R_2' , R_2'' , R_3' e R_4' são como definidos para a fórmula (II), seguida por oxidação do grupo $R_1''-CH_2OH$ para produzir um composto de fórmula (III), em que R_1'' é $-CHO$; e R_2' , R_2'' , R_3' e R_4' são como definidos para a fórmula (II); e, subsequentemente, facultativamente ou se necessário e por qualquer ordem apropriada, a conversão de

R_1'' em R_1 , a conversão de R_2' em R_2 quando R_2'' é hidrogénio ou a conversão de R_2' em R_2 e R_2'' em hidrogénio quando R_2' e R_2'' em conjunto são uma ligação, a conversão de R_3' em R_3 , a remoção dos grupos de protecção de sililo R_4' , a interconversão de R_2 , a interconversão de R_3 e a formação de um sal farmacologicamente aceitável.

2a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por R_1' ser um éster ou tioéster de alquilo, arilo ou heteroarilo, haleto de ácido, um anidrido de ácido ou uma amida.

3a - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o reagente organometálico Y-M, na variante de processo (a), ser um reagente de Grignard.

4a - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o agente de redução, na variante de processo (b), ser um agente de redução boro-hidreto.

5a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável em que R_1 é formilo, acetilo, pent-4-enilo, benzoilo ou 2-pirrolilcarbonilo.

6a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável em que R_2 é hidróxi ou metóxi.

7a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável em que R_3 é hidrogénio, acetilo, trifluoroacetilo ou 9-fluorenilmetoxicarbonilo.

8a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável em que R_1 é formilo, acetilo, pent-4-enoilo, benzoilo ou 2-pirrolilcarbonilo; R_2 é hidróxi ou metóxi; R_3 é hidrogénio, acetilo, trifluoroacetilo ou 9-fluorenilmetoxicarbonilo; e cada R_4 é hidrogénio.

9a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por se prepararem:

N-acetil-16-acetil-16-descarboxianfotericina B;

16-acetil-16-descarboxianfotericina B;

16-benzoil-16-descarboxianfotericina B;

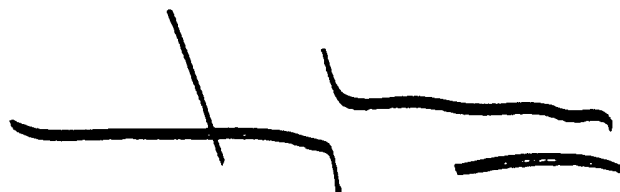
16-(3-butenilcarbonil)-16-descarboxianfotericina B; ou

16-descarboxi-16-(2-pirrolilcarbonil)anfotericina B;

10a - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, útil para o tratamento de infecções fúngicas em animais, caracterizado por compreender a mistura de uma dose

unitária de um composto de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável, de acordo com a reivindicação 1, com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 11 de Dezembro de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA