



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN



(21) Patentansøgning nr.: 3171/79

(51) Int.Cl.⁴ C 07 H 17/08

(22) Indleveringsdag: 27 jul 1979

(41) Alm. tilgængelig: 28 jan 1981

(44) Fremlagt: 19 sep 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *POLITECHNIKA GDANSKA; Gdansk-Wrzeszcz; ul. Majakowskiego 11/12, PL

(72) Opfinder: Leonard Stanislaw *Falkowski; PL, Barbara Janina *Stefanska; PL, Jan *Zielinski; PL, Elzbieta *Troka; PL, Jerzy *Golik; PL, Pawel *Kolodziejczyk; PL, Andrzej Boguslaw *Jarzelski; PL, Emilia *Cybulska; PL, Edward *Borowski; PL

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske salte af trimethylammoniumderivater af polyenmacrolider indeholdende en alifatisk aminogruppe**

(56) Fremdragne publikationer

DE off. g. skrift nr. 2706156
SU pat. nr. 618111

(57) Sammen drag:

3171-79

Salte af trimethylammoniumderivater af polyenmacrolider, især salte med formlen $[(CH_3)_3N-R-COOCH_2]_n^+X^-$ eller $[R-N(CH_3)_3]_n^+X^-$, hvor R er resten af et polyenmacrolid, og X^- er en anion af saltet, såsom methylsulfat, sulfat, chlorid, fosfat eller acetat, fremstilles ved, at man behandler et polyenmacrolid i organisk opløsningsmiddel med dimethylsulfat i nærværelse af et neutraliseringsmiddel ved stuetemperatur under stadig omrøring, indtil reaktionen er fulddent, derefter udfælder det rå produkt med ethylether opløst i butanol, vasker det organiske opløsningsmiddel med vand og koncentrerer under reduceret tryk, udfælder produktet ved tilsætning af ethylether og eventuelt på kendt måde omdanner methylsulfatet til andre salte.

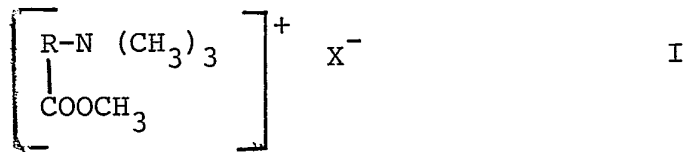
Forbindelserne er antifungalt og hæmolytisk virksomme antibiotika.

Polyenmacrolidantibiotika anvendes almindeligt i terapien af svampeinfektioner hos mennesket og hos dyr og til forebyggelse eller fjernelse af svampeforureninger af forskellige materialer.

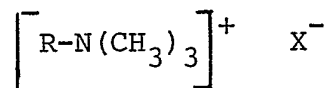
5 Der kendes allerede nogle derivater af polyenmacrolider, der udviser nogle egenskaber, som er mere ønskelige end stamantibiotikaene. Kendt er komplekset af amphotericin B med natriumdeoxycholat, N-acylderivaterne af polyenmacrolider (amerikansk patent nr. 3.244.570, 1966), hydrochloriderne af methylestere af polyenmacrolider (W. Mechliński, 10 C.P. Schaffner, J. Antibiot. 25, 256, 1964), kondensationsproduktet af formaldehyd med candidin (France Per., Rhone-Poulenc 41.272) eller reaktionsproduktet af polyenmacrolider med polysaccharider oxygenet efter behandling med 15 perjodat (belgisk patent nr. 620.619) og N-glycosylderivaterne af polyenmacrolider (belgisk patent nr. 787.531). De ovennævnte derivater udviser imidlertid nogle andre uønskede egenskaber, f.eks. udviser N-acylpolyenmacroliderne betydeligt lavere antifungal virkning, og saltene 20 af methylestere af disse antibiotika er ret ustabile.

Endvidere kendes fra USSR patentskrift nr. 618111 og tysk offentliggørelsesskrift nr. 2706156 trimethylammoniumderivater af polyenmacrolider. Disse forbindelser har imidlertid en usubstitueret carboxylgruppe og er uopløselige i vand ligesom stamantibiotikaene, hvilket er til forskel fra de i den foreliggende ansøgning omhandlede forbindelser, der har en forestret carboxylgruppe og er kationer, som danner salte med anioner. 25 Forestringen af carboxylgruppen har endvidere den fordel at nedsætte stoffernes giftvirkning.

30 Opfindelsen angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske uorganiske salte af trimethylammoniumderivater af polyenmacrolider indeholdende en aminogruppe især de uorganiske salte af methylestere af disse derivater med den almene formel I



5 hvor R er resten af polyenmacrolidet, som er forbundet med en methyleret carboxylgruppe og er bundet til aminogruppen, og X^- er anionen af saltet, eller med den almene formel II



10 hvor R er resten af polyenmacrolidet bundet til aminogruppen, og X^- har den ovennævnte betydning, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at polyenmacrolidet i et organisk opløsningsmiddel eller en blanding af opløsningsmidler behandles med dimethylsulfat i nærværelse af et neutraliseringsmiddel ved stuetemperatur under stadig omrøring, indtil fuldendelse af reaktionen, og det fremkomne produkt udfældes ved tilsætning
15 af ethylether og opløses i butanol, den organiske opløsning vaskes med vand, koncentrerer under reduceret tryk, og det således dannede methylsulfat om ønsket omdannes til et andet uorganisk salt på i og for sig kendt måde.

20

Produktet af den almene formel I, d.v.s. methylsulfat af N,N,N-trimethylpolyenmacrolidmethylester, eller af den almene formel II, d.v.s. methylsulfat af polyenmacrolid, udfældes ved tilsætning af ethylether.

25 Som polyenmacrolider kan anvendes: nystatin, polifungin, amphotericin B, candicidin, pimaricin, trichomycin, levorin, rimocidin, candidin, aureofacin, perimycin, mycoheptin.

30 Som organiske opløsningsmidler blev anvendt: dimethylacetamid, dimethylformamid, dimethylsulfoxid og alifatiske alkoholer med en kædelængde på $\text{C}_1\text{-C}_5$.

Som neutraliseringsmiddel blev anvendt natriumbicarbonat.

I polyenmacroliderne indeholdende en aromatisk aminogruppe er denne gruppe substitueret med en eller to methylgrupper. Disse antibiotika er repræsenteret ved levorin, candicidin, trichomycin, aureofacin, perimycin.

- 5 Det er blevet vist, at reaktionsbetingelserne, der anvendes ifølge opfindelsen, er tilstrækkeligt milde til at forhindre nedbrydning af antibiotikaene. Behandling af polyenmacrolidet med dimethylsulfat under betingelser kendt fra litteraturen skulle bevirke åbning af macrolidringen, fjernelse af sukkerdelen og nedbrydning af polyen chromoforen, resulterende i tab af den biologiske virkning.
- 10

De antimikrobielle og hemolytiske virkninger in vitro af DMS polyenmacrolider og stamantibiotikaene er vist i tabel 1.

- 15 Strukturen af de fremkomne derivater er blevet dokumenteret ved hjælp af spektroskopiske metoder. Som eksempel er vist fremgangsmåden anvendt til identifikation af candicidinderivatet, nærmere betegnet DMS candicidin, fremkommet ved behandling af antibiotikumet med dimethylsulfat under de foreslåede alkyleringsbetingelser. Sur hydrolyse af candicidin selv giver sukkerdelen mycosamin, hvorimod DMS candicidin gav N,N,N-trimethylmycosamin. Strukturen af stoffet fremgik af massespektret (baseionerne og samtidigt molekyllionerne ved m/e 206) og af det protonmagnetiske resonansspektrum) signal ved $\delta=3,68$ karakteristisk for methylgrupperne bundet til nitrogenatomet med intensitet tre gange større end signalet ved $\delta=1,68$ karakteristisk for protonerne i C-6 methylgruppen i aminosukkeret.
- 20
- 25

- Tilstedeværelsen af esterbindingen i molekylet i derivatet vises af det intensive absorptionsbånd ved $\lambda = 1730 \text{ cm}^{-1}$ i IR spektret og samtidig mangel på absorption ved $\lambda=1590 \text{ cm}^{-1}$, som er karakteristisk for stamantibiotikumet. Den elektroniske absorption af candicidin og dets DMS derivat
- 30

er lidt forskellige i intensiteterne af absorptionsmaksima, hvorimod deres beliggenhed og strukturen af spektret er identiske. Dette gav bevis for, at strukturen af polyenchromoforen forblev uændret ved alkyleringsmetoden.

5 NMR-spektret af per-O-trimethylsilyl-DMS-candicidin viste bånd ved $\delta=3,65$ og $3,03$ karakteristiske for henholdsvis methoxy og N-methylprotoner. Behandling af alkaliske vandige opløsninger af candicidin frigjorde p-aminoacetophenon, medens DMS-candicidin frigjorde N-dimethyl, N-methyl

10 og usubstitueret p-aminoacetophenon i molforholdet 3:5:2.

Fordelene ved derivaterne fremstillet ifølge opfindelsen er deres fuldstændige vandopløselighed sammen med den høje antifungale virkning og forbedrede selektive toksicitet sammenlignet med de naturlige antibiotika.

15 De uorganiske salte af trimethylammoniumderivater af polyenmacrolider, især methylesterne af uorganiske salte af trimethylammoniumderivater af disse antibiotika, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen til deres fremstilling belyses nærmere af følgende eksempler.

20 Eksempel 1

2 g polyfungin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 800$ ved 304 nm) opløses i 10 ml dimethylformamid, og 10 ml methanol, 2 g natriumbicarbonat og 1 ml dimethylsulfat blev tilsat portionsvis, og reaktionsblandingen blev omrørt i 10 timer ved 25°C . Uopløst

25 natriumbicarbonat blev centrifugeret, methanolen inddampet under formindsket tryk, og derivatet blev fældet med ethylether. Produktet blev opløst i 50 ml vand, mættet med butanol, og butanollaget blev vasket to gange med 20 ml vand og koncentreret under formindsket tryk til et rumfang på

30 15 ml. Udfældning med ethylether efterfulgt af vask to gange med ethylether og hexan gav 1,6 g af saltene af N,N,N-trimethylpolyfunginmethylester, som viste $E_{1\text{ CM}}^{1\%} = 700$ ved

304 nm. Det opnåede udbytte er 80% af det teoretiske.

Eksempel 2

2 g nystatin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 860$ ved 304 nm) blev opløst i 50 ml methanol, 2 g natriumbicarbonat blev tilsat, og 2 ml dimethylsulfat tilsat portionsvis. Reaktionsblandingen blev omrørt i 4 timer ved 25°C og yderligere oparbejdet, som beskrevet i eksempel 1. Saltet af N,N,N-trimethylnystatinmethylester fremkom i et udbytte på 1,3 g (75% af det teoretiske), og produktet udviste $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 760$ ved 304 nm.

10 Eksempel 3

1 g amphotericin B ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1420$ ved 383 nm) blev opløst i 20 ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 1 g natriumbicarbonat blev tilsat, og 1 ml dimethylsulfat inddryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt ved 20°C i 24 timer og yderligere oparbejdet som i eksempel 1. Der fremkom 0,9 g af saltet af N,N,N-trimethylamphotericin B methylester, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 900$ ved 382 nm, hvilket er 90% af det teoretiske udbytte. Det fremkomne stof blev rensset ved hjælp af modstrømsfordeling i opløsningsmiddel-systemet: chloroform-methanol-vand (2:2:1). Der fremkom 0,3 g salt af N,N,N-trimethylamphotericinmethylester, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1400$ ved 382 nm.

Eksempel 4

1 g candidin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 820$ ved 383 nm) blev opløst i 20 ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 1 ml dimethylsulfat tildryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 20°C og oparbejdet som i eksempel 1. Der fremkom 0,5 g af saltet N,N,N-trimethylcandidinmethylester, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 550$ ved 382 nm, hvilket er 80% af det teoretiske udbytte. Produktet blev rensset ved søjlekromatografi på silicagel,

der først var mættet med vand i opløsningsmiddelsystemet chloroform-methanol-vand (20:10:1). Der fremkom 0,2 g af derivatet af candidin, der viser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 850$ ved 378 nm.

Eksempel 5

5 1 g trychomycin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 450$ ved 378 nm) blev opløst i 20 ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1. 1 g natriumbicarbonat blev tilsat, og 1 ml dimethylsulfat blev inddryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 20°C og yderligere oparbejdet som i eksempel 1. Der fremkom 0,6 g DMS-trychomycin, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$ ved 378 nm.

Eksempel 6

15 1 g pimaricin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 960$ ved 304 nm) blev opløst i 20 ml methanol. 1 g natriumbicarbonat blev tilsat, og 1 ml dimethylsulfat blev inddryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 25°C og oparbejdet som beskrevet i eksempel 1. Der fremkom 0,85 g af saltet af N,N,N-trimethylammoniummethylester, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$ ved 304 nm, hvilket er 80% af det teoretiske udbytte.

20 Eksempel 7

25 1 g levorin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 800$ ved 378 nm) blev opløst i 30 ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 1 ml dimethylsulfat inddryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 20°C og oparbejdet som beskrevet i eksempel 1. Der fremkom 0,7 g DMS-levorin, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$ ved 304 nm, hvilket er 70% af det teoretiske udbytte.

Eksempel 8

1 g rimocidin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$ ved 304 nm) blev opløst i 20

ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 1 ml dimethylsulfat inddryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 20°C og oparbejdet som i eksempel 1. Der fremkom 0,8 g af saltet N,N,N-trimethylrimocidinmethylester, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$ ved 304 nm, hvilket er 80% af det teoretiske udbytte.

Eksempel 9

0,1 g perimycin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 650$ ved 380 nm) blev opløst i 2 ml dimethylacetamid-methanol i forholdet 10:1, og 0,1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 0,1 ml dimethylsulfat tildryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 10 timer ved 20°C og oparbejdet som i eksempel 1. Der fremkom 0,05 g DMS-perimycin, som udviste $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$ ved 380 nm, hvilket er 50% af det teoretiske udbytte.

Eksempel 10

1 g aureofacin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 800$ ved 379 nm) blev opløst i dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 1 ml dimethylsulfat tildryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 20 timer ved 20°C og oparbejdet som i eksempel 1. Der fremkom 0,7 g DMS-aureofacin, som viser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 760$ ved 378 nm, hvilket er 65% af det teoretiske udbytte.

Eksempel 11

0,1 g candicidin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 400$ ved 378 nm) blev opløst i 5 ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 0,1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 0,1 ml dimethylsulfat tildryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 20°C og oparbejdet som beskrevet i eksempel 1. Der fremkom 0,04 g DMS-candicidin, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$ ved 378 nm, hvilket er 45% af det teoretiske udbytte.

Eksempel 12

1 g mycoheptin ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$ ved 383 nm) blev opløst i 20 ml dimethylformamid-methanol i forholdet 10:1, og 1 g natriumbicarbonat blev tilsat og 1 ml dimethylsulfat tildryppet. Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved 20°C og oparbejdet som beskrevet i eksempel 1. Der fremkom 0,5 g af saltet af N,N,N-dimethyl-mycoheptinmethylester, som udviser $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 680$ ved 380 nm, hvilket er 85% af det teoretiske udbytte.

10 Tabel

Antifungale og hæmolytiske virkninger af polyenmacrolider og deres DMS derivater.

Antibiotikum	IC ₅₀ (mcg/ml)	EH ₅₀ (mcg/ml)
pimaricin	1	100
15 DMS-pimaricin	1,7	400
polifungin	0,08	20
DMS-polifungin	0,15	120
nystatin	0,1	50
DMS-nystatin	0,25	100
20 rimocidin	1,5	30
DMS-rimocidin	2,5	50
amphotericin B	0,03	5
DMS-amphotericin B	0,08	5
mycoheptin	0,05	15
25 DMS-mycoheptin	0,2	65
candidin	0,054	20
DMS-candidin	0,15	70
candicidin	0,005	2,5
DMS-candicidin	0,005	15
30 aureofacin	0,005	0,35
DMS-aureofacin	0,003	15

	levorin	0,007	2,5
	DMS-levorin	0,009	20
	trychomycin	0,005	3
	DMS-trychomycin	0,01	10
5	perimycin	0,002	5
	DMS-perimycin	0,003	12

I tabellen betyder DMS saltet af N,N,N-trimethylesteren af antibiotikumet eller saltet af N,N,N-trimethylantibiotikum.

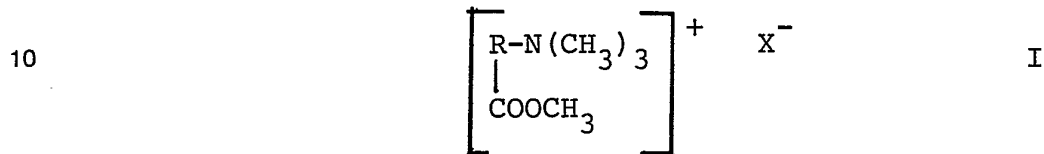
10 IC_{50} betyder den koncentration af stoffet, som forårsager 50% hæmning af væksten af *Saccharomyces cerevisiae* celler i flydende standardmedium bestemt spektrofotometrisk ved $\lambda = 600$ nm efter 24 timers inkubation ved $28^{\circ}C$.

15 EH_{50} betyder den koncentration af stoffet, som forårsager 50% hæmoglobin bestemt spektrofotometrisk ved $\lambda = 550$ nm.

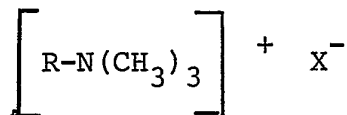
0

P a t e n t k r a v

5 Analogifremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske uorganiske salte af trimethylammoniumderivater af polyenmacrolider indeholdende en aminogruppe, især de uorganiske salte af methylestere af disse derivater med den almene formel I



hvor R er resten af polyenmacrolidet, som er forbundet med en methyleret carboxylgruppe og er bundet til aminogruppen, og X⁻ er anionen af saltet, eller med den almene formel II

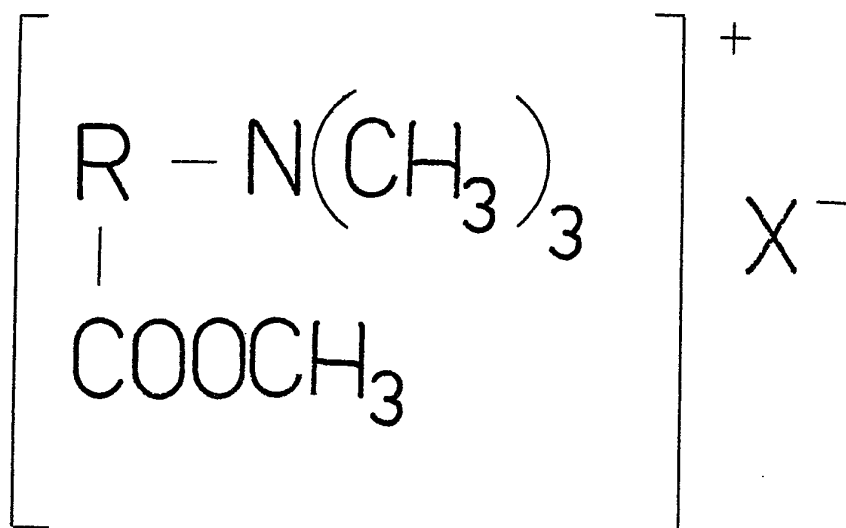


20 hvor R er resten af polyenmacrolidet bundet til aminogruppen, og X⁻ har den ovennævnte betydning, k e n d e t e g n e t ved, at polyenmacrolidet i et organisk opløsningsmiddel eller en blanding af opløsningsmidler behandles med dimethylsulfat i nærværelse af et neutraliseringsmiddel ved stuetemperatur under stadig omrøring indtil fuldendelse af reaktionen, og det fremkomne produkt udfældes ved tilsætning af ethylether

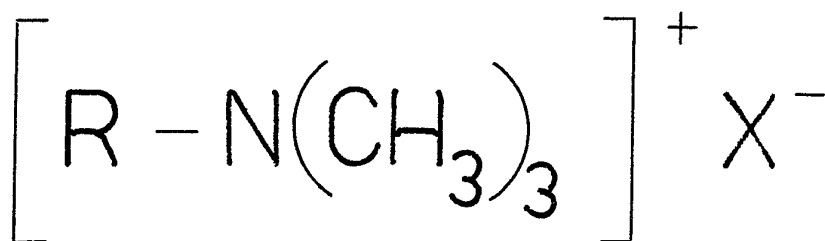
25 og opløses i butanol, den organiske opløsning vaskes med vand, koncentrerer under reduceret tryk, og det således dannede methylsulfat om ønsket omdannes til et andet uorganisk salt på i og for sig kendt måde.

30

35



formel I



formel II