



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 92540 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 8829593

(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
WILLIAM SKINNER MACLACHLAN GB
ANDREW WILLIAM TAYLOR 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.]

72.540

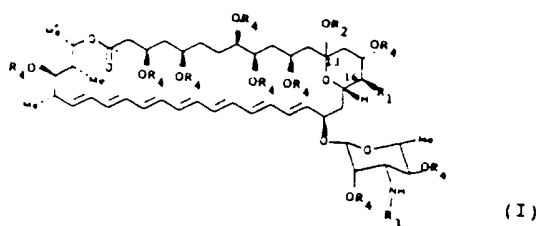
BEECHAM GROUP p.l.c.,

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE ANFOTERICINA B"

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

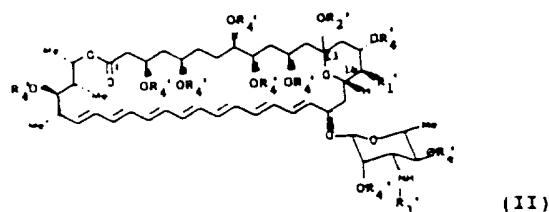
O presente invento refere-se a um processo para a preparação dos compostos de fórmula (I), ou dos seus sais farmacologicamente aceitáveis:



na qual R_1 é $-\text{CH}_2\text{OH}$; R_2 é hidrogénio ou alquilo C_{1-8} ; R_3 é hidrogénio ou um grupo de protecção de amina; e cada R_4 é hidrogénio. O presente invento também se refere à preparação de

composições farmacêuticas contendo aqueles e à sua utilização para o tratamento de infecções fúngicas.

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

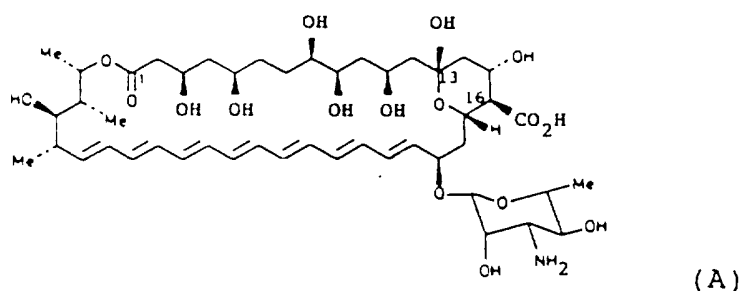


na qual R_1' é um derivado de ácido carboxílico activado; R_2' é alquilo C_{1-8} ; R_3' é um grupo de protecção de amina; e cada R_4' é hidrogénio; e subsequentemente, facultativamente ou se necessário e por qualquer ordem apropriada, a conversão de R_2' em R_2 , a conversão de R_3' em R_3 , a interconversão de R_2 , a interconversão de R_3 e a formação de um sal farmacêuticamente aceitável.

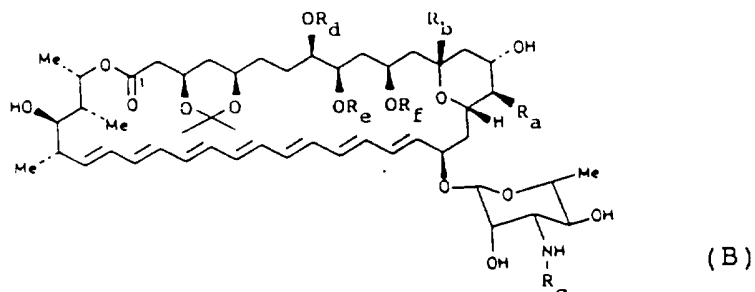
O presente invento refere-se a novos compostos, à sua preparação e à sua utilização no tratamento de infecções fúngicas em animais, incluindo o ser humano.

A anfotericina B de macrolido de polieno, produzida pelo 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 determinadas com precisão por meio de análise cristalográfica de raios-x. A anfotericina B tem a fórmula (A):



Os derivados de anfotericina B encontram-se referidos na literatura da especialidade. Nicolaou et al. (J. American Chem. Soc., 110, 4660, (1988)) descreve a síntese de um composto de fórmula (B):

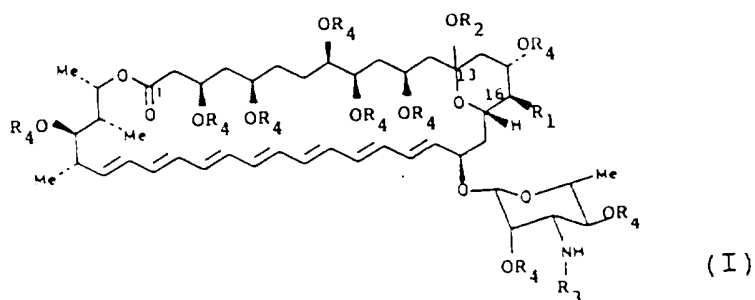


na qual R_a é $-\text{CH}_2\text{OH}$, R_b é metóxi, R_c é acetilo e, ou R_d é hidrogénio e R_e e R_f em conjunto são isopropilideno, ou R_d e R_e em conjunto são isopropilideno e R_f é hidrogénio.

Não se encontrou qualquer actividade farmacológica nos compostos de fórmula (B).

No entanto, prepararam-se agora novos derivados de anfotericina B que possuem um grupo de hidroximetilo na posição 16, os quais mostraram possuir actividade anti-fúngica e, portanto, ter uma utilidade potencial como agentes anti-fúngicos.

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



na qual R_1 é $-\text{CH}_2\text{OH}$; R_2 é hidrogénio ou alquilo C_{1-8} ; R_3 é hidrogénio ou um grupo de protecção de amina; e cada R_4 é hidrogénio.

A menos que seja indicado de outra forma, um grupo alquilo é de preferência um grupo alquilo C_{1-6} , mais preferivelmente um grupo alquilo C_{1-4} e pode ser de cadeia linear ou ramificada.

O termo farmacêuticamente aceitável engloba os solvatos e os hidratos. Deste modo, quando os compostos de fórmula (I), ou os seus sais farmacêuticamente aceitáveis, formam solvatos ou hidratos, estes também constituem um aspecto do presente 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 farmacêuticamente aceitáveis, por exemplo clorídrico, bromídrico, fosfórico, acético, fumárico, salicílico, cítrico, láctico, mandélico, tartárico, oxálico, metanossulfónico, aspártico e ascórbico. O invento também abrange os sais quaternários.

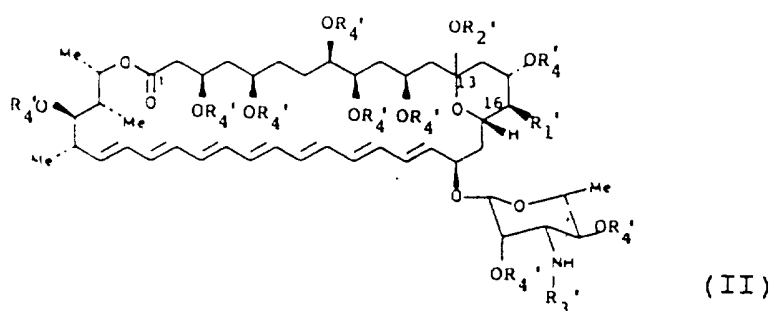
Os significados para R_3 são hidrogénio, acetilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo, tricloroetoxycarbonilo, 2-metilsulfoniletoxycarbonilo e 2-trimetilsililetoxycarbonilo. De preferência, R_3 é hidrogénio, acetilo ou 9-fluorenilmetoxycarbonilo. Com maior preferência, R_3 é hidrogénio.

Incluídos dentro âmbito dos compostos em que R_3 é um grupo de protecção de amina encontram-se também outros derivados de grupos amino, que compreendem derivados de acilo que suportam um substituinte básico, tais como derivados de N-D-lisilo e de N-D-ornitilo, derivados de guanidina e derivados de N-glicosilo.

A preparação de outros derivados de grupos amino é descrita na Publicação da Patente Europeia 0 010 297 (Schering), na Publicação da Patente Europeia 0 031 722 (Dumex) e na Patente Norte Americana 4 195 172.

Os significados preferidos para R_2 são hidrogénio e metilo.

O presente invento também proporciona um processo para a preparação dos compostos de fórmula (I), o qual compreende a redução selectiva de um composto de fórmula (II):



na qual R_1' é um derivado de ácido carboxílico activado; R_2' é alquilo C_{1-8} ; R_3' é um grupo de protecção de amina; e cada R_4' é hidrogénio; e subsequentemente, facultativamente ou se necessário e por qualquer ordem apropriada, a conversão de R_2' em R_2 , a conversão de R_3' em R_3 , a interconversão de R_2 , a interconversão de R_3 e a formação de um sal farmacologicamente aceitável.

Dever-se-á entender que o termo derivado de ácido carboxílico activado, quando utilizado aqui, compreende um grupo de ácido carboxílico modificado por reacção química para uma

forma activada sujeitável a redução por reacção com um agente de redução selectiva.

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

Um derivado de ácido carboxílico R_1' activado para reacção com um agente de redução selectiva é apropriadamente um éster de alquilo C_{1-6} , tal como metoxycarbonilo ou etoxycarbonilo, ou um tioéster, de preferência um heteroariltioéster, tal como piridiltioéster.

Favoravelmente, R_1' é metoxycarbonilo ou 2-piridiltiocarbonilo.

Os significados adequados para R_2' são metilo e etilo, e de preferência metilo.

Os grupos de protecção de amina R_3' são escolhidos de forma que sejam estáveis relativamente ao processo de redução utilizado na preparação dos compostos de fórmula (I). De preferência, um grupo de protecção de amina R_3' é prontamente removível logo a seguir ao processo de redução, para produzir um composto de fórmula (I) em que R_3 é hidrogénio.

Os significados para R_3' são acetilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo, tricloroetoxycarbonilo, 2-metilsulfoniletoxycarbonilo e 2-trimetilsililetoxycarbonilo. Favoravelmente, R_3' é acetilo ou 9-fluorenilmetoxycarbonilo e de preferência 9-fluorenilmetoxycarbonilo.

A redução selectiva dos compostos de fórmula (II) pode ser efectuada através da utilização de um agente de redução de boroidreto, tal como boroidreto de sódio ou boroidreto de lítio, de preferência boroidreto de sódio, num solvente tal como metanol ou numa mistura de solventes tal como de metanol-tetraidrofurano. A redução eficaz pode ser obtida por utilização de um excesso de um agente de redução, por exemplo desde 10 a 30 equivalentes molares, a temperaturas reduzidas ou elevadas, por exemplo entre -30°C e 50°C . De preferência, o agente de redução é adicionado a uma solução de um composto de fórmula (II) a uma temperatura reduzida, por exemplo 0°C , e a mistura de reacção é então deixada atingir a temperatura ambiente. Os tempos de reacção variam de acordo com as condições da reacção e com o composto de fórmula (II) escolhido. Os tempos de reacção podem por exemplo variar entre 0,1 e 3 horas e normalmente variam entre 0,2 e 1 hora.

Quando R_2 nos compostos de fórmula (I) é hidrogénio, a conversão de R_2' alquilo C_{1-8} em R_2 hidrogénio pode ser efectuada sob condições ácidas-catalizadas por meio da utilização de água ou de uma mistura de água e tetraidrofurano como solvente, de preferência por utilização de uma mistura de solventes compreendendo 10-50% de água em tetraidrofurano. Um catalizador ácido adequado para esta reacção é o ácido 10-canforsulfónico ou o p-toluenossulfonato de piridínio. A reacção pode ser efectuada a uma temperatura reduzida ou elevada, por exemplo entre -30°C e 50°C e preferivelmente entre 0°C e a temperatura ambiente, durante um período que varia entre 0,1 e 5 horas e de preferência entre 0,3 e 2 horas.

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

Por exemplo, um grupo de protecção amina R_3' , tal como 9-fluorenilmetoxicarbonilo, pode ser removido sob condições básicas num solvente tal como sulfóxido de dimetilo metanólico. As bases adequadas para a desprotecção da amina podem ser 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 de 1 a 2 equivalentes, a uma temperatura reduzida ou elevada, por exemplo entre -30°C e 50°C e de preferência entre 0°C e a temperatura ambiente, durante um período de tempo que pode variar entre 1 minuto e 5 horas e de preferência entre 30 minutos e 2,5 horas.

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

- (a) activação do grupo carboxi da posição 16, por exemplo por esterificação, para produzir um éster ou tioéster de alquilo $C_{1-6} R_1'$;
- (b) permuta selectiva do grupo hidroxilo anomérico da posição 13 para produzir um grupo alquilo $C_{1-8} R_2'$; e
- (c) protecção da função amina da metade de açúcar da posição 19 com um grupo de protecção de amina R_3' .

O grupo carboxilo da posição 16 pode, por exemplo, ser convertido num grupo metoxycarbonilo R_1' por utilização de diazometano num solvente etéreo a uma temperatura reduzida.

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 catalizador ácido, tal como ácido 10-canforsulfónico ou p-toluenosulfonato de piridínio sob condições anidras. A reacção pode ser efectuada num solvente inerte, tal como tetraidrofurano, e o álcool pode actuar quer total, quer parcialmente, como solvente. A reacção é efectuada convenientemente na presença de um eliminador- H_2O , por exemplo de crivos moleculares e/ou sob uma atmosfera inerte. Os grupos de protecção de amina R_3' podem ser introduzidos por processos correntes. Por exemplo, um grupo de protecção de amina acetilo R_3' pode ser introduzido por reacção de uma função de amina primária da metade de açúcar com anidrido acético numa mistura de solventes de metanol-sulfóxido de dimetilo a uma temperatura reduzida, por exemplo a $0^\circ C$.

Um grupo de protecção de amina 9-fluorenilmetoxycarbonilo R_3' pode ser introduzido 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, um grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo R_3' pode ser introduzido por adição de N-(9-fluorenilmetoxycarbonilóxi)succinimida a uma mistura da amina primária em metanol-dimetilformamida sob condições anidras, na presença de uma base tal como piridina.

Os compostos intermediários de fórmula (I) são compostos novos e portanto fazem parte do invento.

Determinados compostos intermediários, derivados da anfotericina B através das etapas (a) a (c), como anteriormente descrito, os quais são eles próprios precursores dos compostos de fórmula (II), são compostos novos e portanto fazem parte do invento.

Se necessário, os compostos de fórmula (I), nos quais R_2 é hidrogénio e/ou R_3 é hidrogénio, podem ser convertidos nos compostos de fórmula (I), nos quais R_2 é alquilo 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).

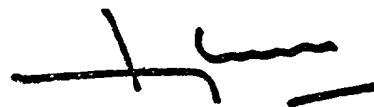
Os compostos de fórmula (I) e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis são agentes anti-fúngicos, potencialmente úteis para o combate de infecções fúngicas em animais, incluindo seres humanos. Por exemplo, eles são potencialmente úteis para o tratamento de infecções fúngicas tópicas no ser humano provocadas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

preferência destinada a utilização em seres humanos na forma de comprimidos, cápsulas, injeções e cremes.

Para utilização em seres humanos, os compostos anti-fúngicos de fórmula (I), ou os seus sais farmacêuticamente aceitáveis, podem ser administrados isoladamente, mas normalmente são administrados em mistura com um veículo farmacêutico seleccionado face à via de administração pretendida e à prática farmacêutica corrente. Por exemplo, eles podem ser administrados oralmente na forma de um comprimido contendo excipientes tais como amido ou lactose, ou de uma cápsula ou óvulo quer isoladamente, quer em mistura com excipientes, ou na forma de um elixir ou suspensão contendo 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 aquosa esterilizada que pode conter outras substâncias, por exemplo, sais ou glucose em quantidade suficiente para tornar a solução isotónica.

Para administração oral ou parentérica a seres humanos, espera-se que o nível de dosagem diária dos compostos anti-fúngicos de fórmula (I) varie entre 0,1 e 1 mg/kg (em doses divididas), quando administrados quer pela via oral, quer pela via parentérica. Deste modo, os comprimidos ou cápsulas dos compostos contêm entre 5 mg e 0,5 g do composto activo para administração única, ou por duas ou mais vezes, conforme apropriado. De qualquer maneira, o médico determinará a dosagem efectiva mais adequada para um doente e essa variará com a idade, com o peso e com a reacção do doente em causa. As dosagens anteriores são exemplificativas do caso médio. Poderão, evidentemente, haver casos individuais em que se devem administrar gamas de dosagem



superiores ou inferiores. Estas encontram-se também 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, podem ser incorporados num creme que consiste numa emulsão aquosa de polietilenos glicóis ou parafina líquida; ou podem ser incorporados, com uma concentração entre 1 e 10%, numa pomada constituída por uma base de cera branca ou de parafina macia branca, conjuntamente com estabilizadores e preservativos, conforme forem necessários.

Dentro da gama de doses indicada, não se observaram quaisquer efeitos tóxicos prejudiciais relativamente aos compostos do invento, os quais foram administrados a doentes adequados para o tratamento de infecções fúngicas.

O presente invento proporciona ainda um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável para utilização como uma substância terapêutica activa.

Um composto para utilização como substância terapêutica activa tem utilidade no tratamento de perturbações em animais incluindo seres humanos. Como referido anteriormente, os compostos de fórmula (I) e os seus sais farmacologicamente aceitáveis possuem actividade anti-fúngica e são potencialmente úteis para combater infecções fúngicas em animais, incluindo seres humanos.

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

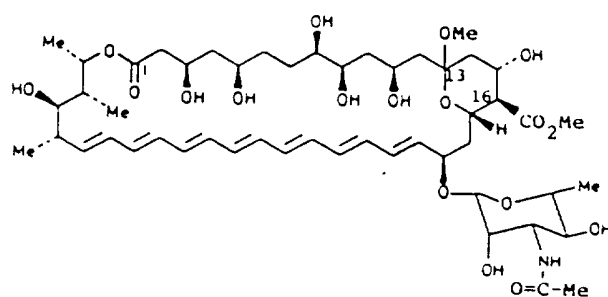
O presente invento proporciona ainda um método de tratamento de infecções fúngicas em animais, incluindo seres humanos, o qual compreende a administração ao animal de uma quantidade anti-fúngica eficaz de um composto de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável.

O presente invento também proporciona a utilização de um composto de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável para a manufatura de um medicamento para utilização como substância terapêutica activa para o 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 novos intermediários.

Descrição 1

éster metílico de N-acetil-13-O-metilanfotericina E (D1)



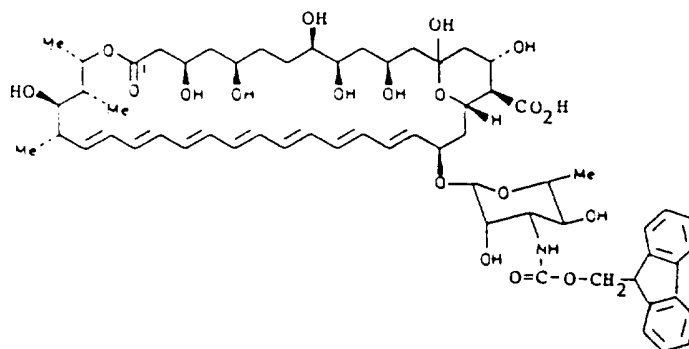
(D1)

éster metílico de N-acetilanfotericina B¹ (0,30 g, 0,31 mmoles) foi dissolvido em metanol seco (14 ml) e tetraidrofurano seco (3 ml) sob uma atmosfera de azoto. Adicionou-se ácido 10-canforsulfônico anidro (0,03 g, 0,13 mmoles) e a solução foi agitada durante 0,5 horas. Adicionou-se trietilamina (0,02 ml, 0,15 mmoles) e a solução foi concentrada in vacuo. A solução concentrada foi deitada em éter dietílico seco em sódio (400 ml) e o precipitado foi filtrado e lavado com éter dietílico seco em sódio (100 ml) para produzir o composto do título (D1) que foi utilizado sem purificação adicional.

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

Descrição 2

N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B (D2)

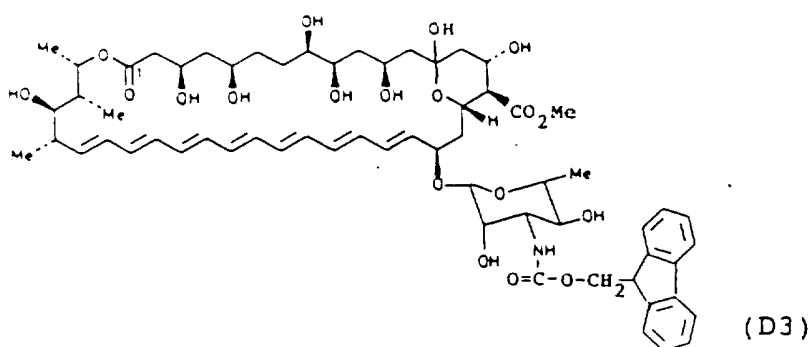


(D2)

A uma solução de anfotericina B (0,50 g, 0,54 mmoles) e carbonato de potássio anidro (0,17 g, 1,2 mmoles) em dimetilsulfoxido 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 mmoles). Depois de se ter agitado durante 1 hora, adicionou-se mais uma porção de cloroformato de 9-fluorenilmetilo (0,04 g, 0,17 mmoles). Após 0,25 horas, a mistura de reacção foi deitada em água destilada (200 ml). O precipitado foi recolhido por centrifugação, foi dissolvido em metanol e foi evaporado in vacuo. O resíduo foi dissolvido no volume mínimo de uma mistura de tetraidrofurano e metanol (1:1) e foi deitado em água destilada (200 ml, ajustado para pH 3,2 por meio da adição de ácido acético glacial). O precipitado foi centrifugado, foi lavado com água e foi seco in vacuo para produzir o composto do título (D2) que foi utilizado sem purificação adicional.

Descrição 3

éster metílico de N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B (D3)



N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B em bruto (D2) (0,36 g, 0,31 mmoles) foi dissolvido em dimetilsulfóxido e metanol 1:1 (20 ml). Adicionou-se uma solução de diazometano em éter dietílico (25 ml), durante 0,3 horas, a 0°C e com agitação. O diazometano foi produzido a partir de: Diazald^R (0,39 g, 1,0 mmoles) e 2-(2-etoxietoxi)etanol (2 ml). A reação foi agitada durante mais 1,5 horas e depois foi temperada cuidadosamente com ácido acético glacial. O produto foi precipitado por colocação do mesmo em éter dietílico. Foi recolhido por centrifugação, foi lavado com éter dietílico, foi dissolvido em metanol e foi evaporado in vacuo.

O material em bruto foi purificado por meio de cromatografia de coluna de pressão média sobre sílica-gel, eluindo-se com misturas de acetato de etilo/metanol. O composto do título (D3) foi obtido sob a forma de um sólido amarelo.

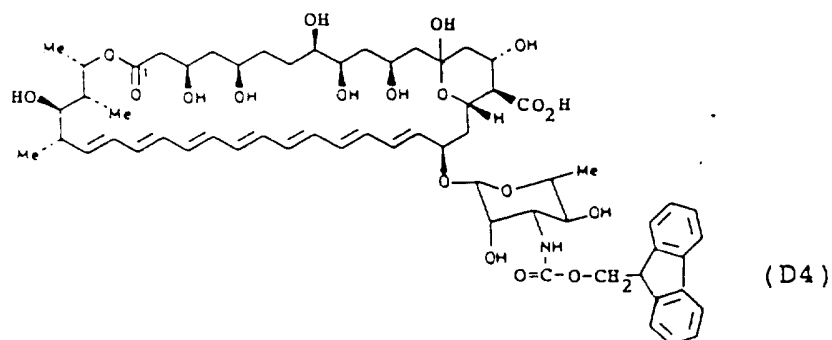
δ_H 270MHz [d_8 -THF/ d_4 -MeOH] 7,78 (2H,d,J 6,9 Hz), 7,70 (2H,d,J 7,4 Hz), 7,35 (2H,dd,J 7,4 e 6,3 Hz), 7,28 (2H,t, 7,4 Hz), 6,63-5,93

(13 H, complexo), 5,50 (1H,m), 5,32 (1H,dd,J 10,2 e 14,8 Hz), 4,75-4,04 (10H, complexo), 3,90-3,0 (8H, complexo), 3,74 (3H,s) 2,50-1,15 (19H, complexo), 1,28 (3H,d,J 6,2 Hz), 1,20 (3H,d,J 6,3 Hz), 1,10 (3H,d,J 6,3 Hz) e 0,99 (3H,d,J 7,2 Hz) ppm.

Clar : com fase invertida : coluna DDS 5µ 250x4,6 mm; eluente 80% de metanol - 20% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 18,8 minutos.

Descrição 4

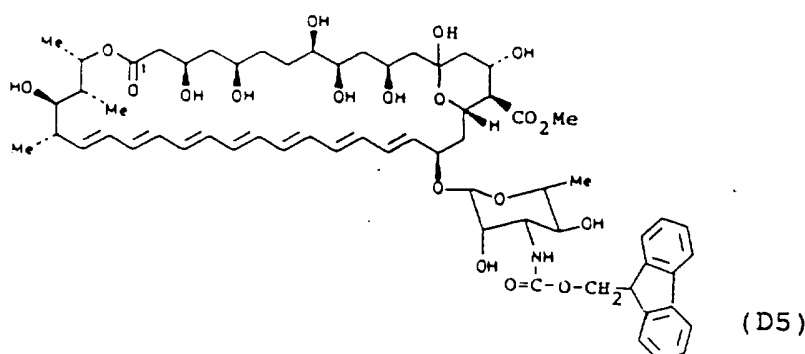
N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfotericina B (D4)



A uma mistura de anfotericina B (4,00 g, 4,33 mmoles) em dimetilformamida seca (240 ml), metanol seco (80 ml) e piridina seca (0,42 ml, 5,19 mmoles) adicionou-se N-(9-fluorenilmetoxycarboniloxi) succinimida (2,36 g, 7,00 mmoles). A reacção foi agitada durante 2 horas, foi diluída com metanol (160 ml) e foi deitada em água destilada (7 litros) a pH 4 (ácido acético). O precipitado foi filtrado, foi lavado e seco in vacuo para produzir o composto do título (D4), que foi utilizado sem purificação adicional.

Descrição 5

éster metílico de N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)anfotericina B
(D5)

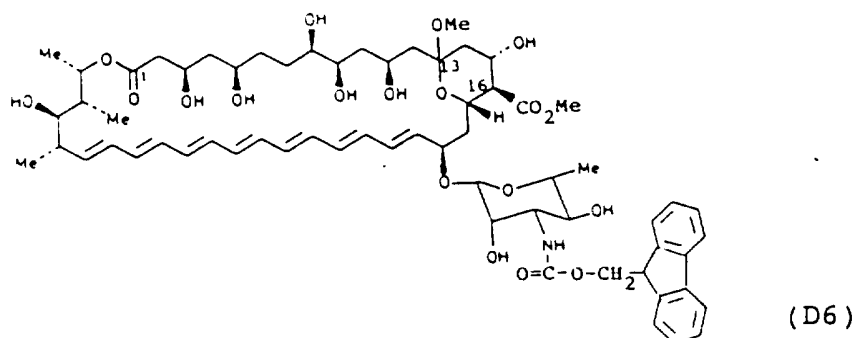


N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)anfotericina B (D4) em bruto (2,11 g, 1,84 mmoles) foi dissolvida numa mistura 1:1 de dimetilsulfóxido e metanol (27 ml). Adicionou-se durante 3 horas, a 0°C e com agitação, uma solução de diazometano em éter dietílico (13 ml). O diazometano foi produzido a partir de: Diazald^R (1,97 g, 9,20 mmoles); hidróxido de potássio (0,56 g, 10,00 mmoles); água (1 ml) e 2-(2-etoxietóxi)etanol (3,3 ml). A reacção foi agitada durante mais 0,5 horas e depois foi temperada cuidadosamente com ácido acético glacial. O produto foi precipitado por vazamento do mesmo em éter dietílico (4 litros), foi filtrado, lavado com éter dietílico e foi seco in vacuo para se obter um sólido amarelo.

Clar: por utilização de fase invertida: coluna ODS 5µ 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 18,8 minutos.

Descrição 6

éster metílico de N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-13-O-metilanfoter-
ricina B (D6)

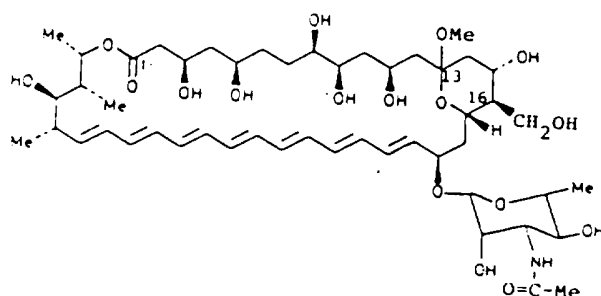


Éster metílico de N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)anfote-
ricina B preparado de acordo com a Descrição 3 ou com a Descrição
5 (7,38 g, $6,36 \times 10^{-3}$ moles) suspenso numa mistura 4:1 de
metanol seco/tetraidrofurano (400 ml) foi tratado com ácido
10-canforsulfónico (1,42 g, $5,66 \times 10^{-3}$ moles), para baixar o pH
da mistura de reacção para cerca de 2,5. Ao fim de 1,2 horas, a
mistura de reacção foi neutralizada com trietilamina (700 µl,
 $5,02 \times 10^{-3}$ moles), foi concentrada e deitada em éter dietílico
(10 litros). O produto amarelo, éster metílico de N-(9-Fluorenil-
metoxycarbonil)-13-O-metilanfotericina B (D6) foi filtrado,
lavado com éter dietílico e seco sob vácuo.

Clar: Coluna 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 12,7 minutos. Espectro de massa FAB
(matriz de tioglicerol) massa observada 1196 - massa calculada
para $C_{64}H_{87}NO_{19}Na = 1196,6$.

Exemplo 1

N-acetil-16-descarbóxi-16-hidroximetil-13-O-metilanfotericina B
(E1)



(E1)

éster metílico de N-acetil-O-metilanfotericina B (D1) (0,24 g, 0,24 mmoles) foi dissolvido em metanol seco (6 ml) e tetraidrofurano seco (2 ml) e adicionou-se em porções boroidreto de sódio sólido (0,23 g, 6,19 mmoles). A solução foi agitada durante 0,75 horas, depois foi concentrada e deitada numa solução saturada de bicarbonato de sódio (250 ml). A solução aquosa foi extraída com misturas de acetato de etilo e de metanol. As fases orgânicas combinadas foram evaporadas in vacuo.

O material em bruto assim obtido foi purificado por meio de cromatografia de coluna de média pressão sobre sílica-gel eluindo-se com a fase inferior de clorofórmio, metanol e solução de amônia concentrada (5:2:2). O composto do título (E1) foi obtido sob a forma de um sólido amarelo.

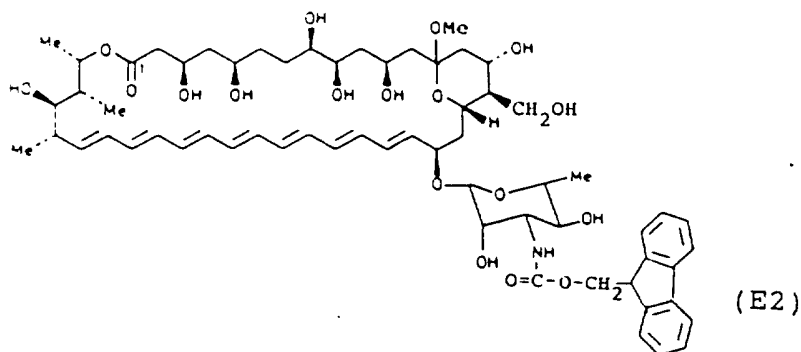
δ_H 270 MHz [(CD₃)₂SO] 7,66 (1H,d,J 8,0 Hz), 6,60-6,00 (12H, complexo), 5,89 (1H,dd,J 7,4 e 15,5 Hz), 5,57 (1H,dd,J 8,1 e 13,5 Hz), 5,01 (1H,m), 4,85-4,15 (14H, complexo), 4,10-3,15 (12H, complexo), 2,99 (3H,s), 2,40-2,05 (4H, complexo), 1,85 (3H,s), 1,83-1,60 (3H, complexo), 1,58-1,30 (12H, complexo), 1,18 (3H,d,J 6,1 Hz), 1,15 (3H,d,J 6,9 Hz), 1,07 (3H,d,J 6,2 Hz) e 0,91 (3H,d,J 7,2 Hz) ppm.

Espectro de Massa: FAB (Matriz de Triglicerol); massas observadas 988 e 965; massa calculada para C₅₀H₇₉NO₁₇Na 988 e massa calculada para C₅₀H₇₉NO₁₇ 965.

Clar : por utilização de fase invertida : Coluna ODS 5 μ 250 x 4,6 mm; eluente 75% de metanol - 25% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 6,2 minutos.

Exemplo 2

N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-16-descarbóxi-16-hidroxi-13-O- -metilanfotericina B (E2)



éster metílico de N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-13-O-
-metilanfotericina B (D6) (6,75 g, $5,75 \times 10^{-3}$ moles), dissolvido
numa mistura 3:1 de metanol/tetraidrofurano (125 ml), foi tratado
com boroidreto de sódio (5,65 g, $1,50 \times 10^{-1}$ moles) a 0°C.
Depois da adição do boroidreto de sódio, a mistura de reacção foi
deixada atingir a temperatura ambiente. Ao fim de 30 minutos,
adicionou-se uma solução saturada de hidrogeno-carbonato de sódio
(3 ml) à mistura de reacção. A mistura foi concentrada e foi
deitada numa solução saturada de hidrogeno-carbonato de sódio (8
litros). O produto amarelo, N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-16-
descarbóxi-16-hidroxi-13-O- -metilanfotericina B (E2), foi
filtrado, foi lavado com água e foi seco sob vácuo.

O material em bruto foi purificado por meio de cromato-
grafia de coluna sobre sílica-gel de fase normal, eluindo-se com
misturas de diclorometano e metanol para produzir o composto do
título (E2).

"nu"máx (disco de KBr) 3415, 2925, 1710, 1510, 1445, 1375, 1320, 1180, 1065, 1005, 900, 845, 760 e 740 cm^{-1} .

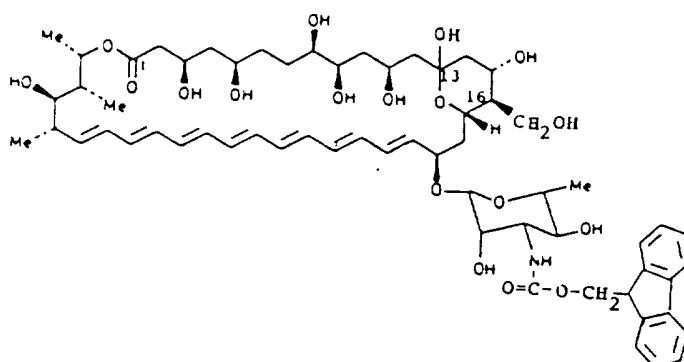
^1H 400 MHz [$(\text{C}_5\text{D}_5\text{N}:\text{CD}_3\text{OD};1:1)$] 7,85 (2H,d,J 7,6 Hz), 7,72 (1H,d,J 7,9 Hz), 7,70 (1H,d,J 7,9 Hz), 7,43 (1H,d,J 7,4 Hz), 7,41 (1H,d,J 7,5 Hz), 7,30 (2H,dd,J 6,4 e 7,2 Hz), 6,60-6,26 (12H, complexo), 6,13 (1H,dd,J 14,7 e 7,6 Hz), 5,59 (1H,m), 5,52 (1H,m), 4,93 (1H,s), 4,82 (1H,m), 4,48 (1H,m), 4,44-4,31 (1H,m), 4,39 (2H,d,J 7,3 Hz), 4,29-4,16 (5H,m), 4,08 (2H,m), 3,98 (1H,m), 3,83 (1H,m), 3,78 (1H,dd,J 9,5 e 9,9 Hz), 3,59 (1H,m), 3,51 (1H,m), 3,48-3,42 (1H,m), 3,24 (3H,s), 2,65-2,35 (5H,m, [incluindo 1H,dd,J 16,7 e 9,2 Hz]), 2,20 (1H,m), 2,10-1,41 (13H, complexo), 1,48 (3H,d,J 6,1 Hz), 1,35 (3H,d,J 6,4 Hz), 1,25 (3H,d,J 6,5 Hz) e 1,16 (3H,d,J 7,1 Hz) ppm.

Espectro de massa FAB (matriz de sódio 3-NDBA) massa observada 1168 - massa calculada para $\text{C}_{63}\text{H}_{87}\text{NO}_{18}\text{Na} = 1168,6$.

Clar: Coluna ODS 5μ 250 x 4,6 mm de fase invertida; eluente 78% de metanol - 22% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 11,0 minutos.

Exemplo 3

N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-16-descarbóxi-16-hidroxi metil-13-O-metilanfotericina B (E3)



(E3)

N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-16-descarboxi-16-hidroxi-metil-13-O-metilanfotericina B (E2) (0,85 g, $7,37 \times 10^{-4}$ moles) suspensa numa mistura 2:1 de tetraidrofurano/água (80 ml) foi tratada com ácido 10-canforsulfónico (0,56 g, $2,24 \times 10^{-3}$ moles) para baixar o pH da mistura de reacção para cerca de 2,5). Ao fim de 0,5 horas, a mistura de reacção foi neutralizada com trietilamina (80 µl, $5,74 \times 10^{-4}$ moles), foi concentrada e deitada em água (2 litros). O produto amarelo resultante foi extraído por centrifugação, foi lavado com água e foi seco sob vácuo.

O material em bruto foi purificado por meio de uma coluna cromatográfica sobre sílica-gel de fase invertida, eluindo-

se com misturas de tetraidrofurano e água. O produto purificado (E3) foi isolado após concentração in vacuo e secagem por congelamento.

"nu"max (disco de KBr) 3408, 3014, 2932, 1709, 1637, 1516, 1451, 1379, 1188, 1070, 1012, 904, 783, 761 e 742 cm^{-1} .

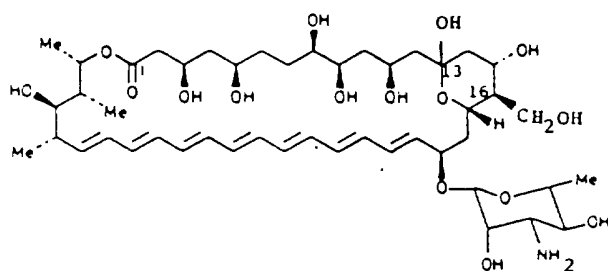
6400MHz [(C₅D₅N:CD₃OD; MIN:MAJ)], 7,84 (2H,d,J 7,7 Hz), 7,72 (1H,d,J 7,8 Hz), 7,70 (1H,d,J 7,8 Hz), 7,42 (1H,d,J 7,4 Hz), 7,40 (1H,d,J 7,5 Hz), 7,31 (1H,d,J 7,2 Hz), , 7,29 (1H,d,J 7,3 Hz), 6,67-6,17 (13H, complexo), 5,59 (1H,m), 5,48 (1H,dd,J 14,4 e 10,2 Hz), 4,90 (1H,s), 4,68 (1H,m), 4,65-4,55 (2H,m), 4,45-4,30 (2H,m), 4,35 (2H,d,J 7,3 Hz), 4,21 (1H,t,J 7,0 Hz), 4,18 (1H,d,J 3,0 Hz), 4,15-3,95 (3H,m), 3,91 (1H,m), 3,82 (1H,m), 3,41-3,31 (2H,m), 2,67 (1H,m), 2,60-2,49 (1H,m), 2,45 (1H,dd,J 16,8 Hz e 9,7 Hz), 2,32 (1H,dd,J 16,8 e 2,6 Hz), 2,26 (1H,m), 2,15-1,38 (14H, complexo), 1,44 (3H,d,J 6,3 Hz), 1,33 (3H,d,J 6,4 Hz), 1,22 (3H,d,J 6,4 Hz) e 1,15 (3H,d,J 7,5 Hz) ppm.

Espectro de massa FAB (matriz de sódio 3-NOBA) massa observada 1154 - massa calculada para C₆₂H₈₅NO₁₈Na = 1154,5.

Clar: Coluna ODS 5µ 250 x 4,6 mm de fase invertida; eluente 80% de metanol - 20% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 13,2 minutos.

Exemplo 4

16-Descarboxi-16-hidroxi metil anfotericina B (E4)



(E4)

N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-16-descarboxi-16-hidroxi-
metil anfotericina B (E3) (0,35 g, $3,01 \times 10^{-4}$ moles) dissolvida
numa mistura de 3,5:1 de sulfóxido de dimetilo/metanol (4 ml) foi
tratada com piridina (58 μ l, $5,89 \times 10^{-4}$ moles). Ao fim de 3
horas, o produto de reacção foi precipitado sob a forma de um
sólido amarelo a partir de éter dietílico (2 litros). O produto
foi recolhido por filtração, foi lavado com éter dietílico e foi
seco sob vácuo.

O material em bruto foi purificado por meio de coluna
de cromatografia sobre sílica-gel de fase invertida, eluindo-se
com misturas de tetraidrofurano e água. O produto purificado
(E4) foi isolado após concentração in vacuo e secagem por conge-
lamento.

"nu"max (disco KBr) 3380, 3005, 2910, 1710, 1630, 1440,
1375, 1320, 1180, 1070, 1010, 880, 845 e 790 cm^{-1} .

^1H 400 MHz $[(\text{C}_5\text{D}_5\text{N}:\text{CD}_3\text{OD}; 1:1)]$, 6,70-6,25 (13H, complexo), 5,64 (1H,m), 5,51 (1H,dd,J 14,6 e 10,2 Hz), 5,02 (1H,s), 4,77 (1H,m), 4,70-4,61 (2H,m), 4,50-4,33 (2H,m), 4,41 (1H,d,J 2,7 Hz), 4,15 (1H,dd,J 11,1 e 3,8 Hz), 4,08 (1H,dd,J 11,1 e 3,4 Hz), 3,96 (1H,m), 3,87 (1H,m), 3,79 (1H,dd,J 9,6 e 9,6 Hz), 3,59 (1H,m), 3,49-3,33 (3H,m), 2,75 (1H,m), 2,63-2,53 (1H,m), 2,49 (1H,dd,J 16,8 e 9,7 Hz), 2,35 (1H,dd,J 16,8 e 2,5 Hz), 2,32 (1H,m), 2,20-1,38 (14H, complexo), 1,46 (3H,d,J 6,1 Hz), 1,36 (3H,d,J 6,4 Hz), 1,25 (3H,d,J 6,4 Hz) e 1,17 (3H,d,J 7,1 Hz) ppm.

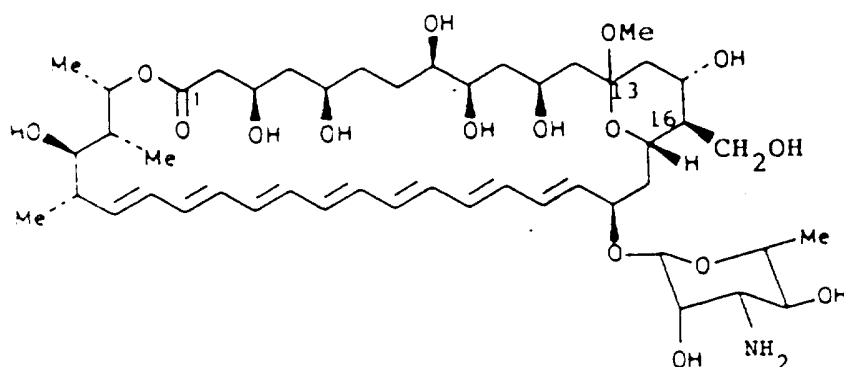
Espectro de massa FAB (matriz de sódio 3-NOBA) massa observada 932 - massa calculada para $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{16}\text{Na} = 932,5$.

Clar: Coluna ODS 5μ 250 x 4,6 mm de fase invertida; eluente 80% de metanol - 20% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 9,6 minutos.

UV-vis (CH_3OH) "lâmbda"max 408 (ϵ , $\text{cm}^{-1}\%$ 1461), 384 (1310), 364 (796) e 345 nm (377).

Exemplo 5

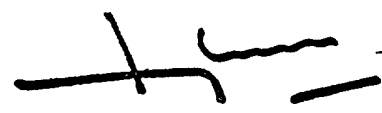
16-Descarboxi-16-hidroxi-13-O-metilanfotericina B (E5)



(E5)

O composto do Exemplo 2 (14 mg, 0,13 mmoles) dissolvido numa mistura 3,5:1 de sulfóxido de dimetilo/metanol (3 ml) foi tratado com piridina (25 µl, 0,25 mmoles). Ao fim de 1,25 horas, a mistura de reacção foi deitada em éter dietílico (0,4 l) e o sólido precipitado foi filtrado e lavado com éter dietílico. O material em bruto foi purificado por meio de cromatografia "flash" sobre sílica-gel, eluindo-se com a fase inferior das misturas clorofórmio:metanol:0,880 de amónia para produzir o composto do título sob a forma de um sólido amarelo.

δ H 400 MHz (d_4 -metanol/ d_5 -piridina): 6,60-6,25 (12H, séries de m), 6,10 (1H, dd, J 14,7 e 7,5 Hz), 5,57 (1H, dd, J 14,4 e 9,6 Hz), 5,49 (1H, m), 4,85 (1H, s), 4,80 (1H, m), 4,44 (1H, m), 4,30 (1H, dt, J 10,6 e 4,7 Hz), 4,20-4,10 (3H, m), 4,12 (1H, d, J 2,9 Hz), 4,03 (1H, dd, J 11,0 e 3,3 Hz), 3,95 (1H, m),

 - 30 -

3,80 (1H, m), 3,52-3,35 (4H, m), 3,23 (3H, s), 2,81 (1H, dd, J 9,2 e 2,9 Hz), 2,60-2,35 (5H, m, incluindo em 2,49 (1H, dd, J 16,7 e 9,1 Hz)), 2,17 (1H, m), 2,06-1,87 (4H, m), 1,85-1,52 (9H, séries de m), 1,42 (3H, d, J 5,6 Hz), 1,33 (3H, d, J 6,4 Hz), 1,23 (3H, d, J 6,4 Hz), 1,14 (3H, d, J 7,1 Hz) ppm.

Espectro de massa: FAB (3-NOBA/matriz de sódio) massa observada 946 - massa calculada para $C_{48}H_{77}NO_{16}Na^+$ = 946,5.

Clar: Coluna ODS μ 250 x 4,6 mm de fase invertida; eluente 76% de metanol - 24% de tampão fosfato pH 3 - 1 ml/min; comprimento de onda de detecção 350 nm; Tempo de retenção 8,6 minutos.

Dados de 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 se tinham desenvolvido previamente num meio de caldo, foram diluídos e adicionados a recipientes para se obter um inóculo final de aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colónias por recipiente. Os tabuleiros foram incubados a 37°C e a turvação de cada recipiente foi registada periodicamente. A CIM foi obtida como a concentração mais baixa (em µg/ml) que evitou um crescimento significativo.

Resultados

Concentração Inibidora Mínima (µg/ml)

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

ORGANISMO	DIA	EXEMPLO 4	
		CNL	CDS
Candida albicans 73/079	2	1	1
	3	2	1
Candida parapsilose 937 A	2	8	1
	3	8	2

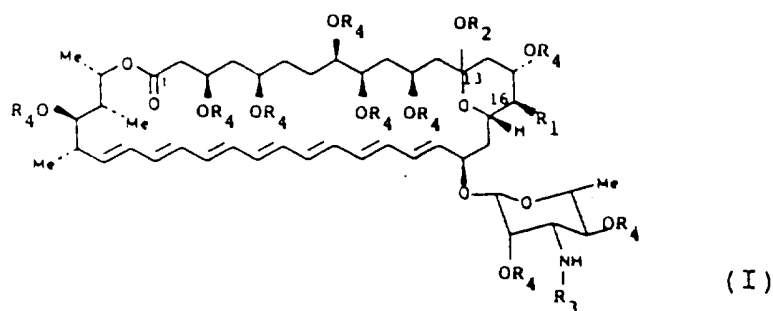
* Inóculo 10^5 células/ml.

CNL: Caldo à base de Nitrogénio de Levedura.

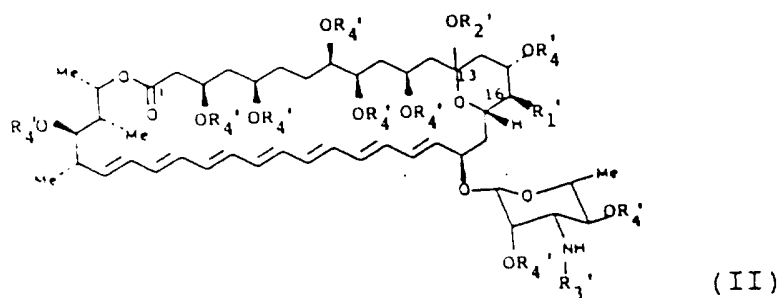
CDS: Caldo de Dextrose de Sabouraud.

REIVINDICAÇÕES:

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



na qual R_1 é $-\text{CH}_2\text{OH}$; R_2 é hidrogénio ou alquilo C_{1-8} ; R_3 é hidrogénio ou um grupo de protecção de amina; e cada R_4 é hidrogénio, caracterizado por compreender a redução selectiva de um composto de fórmula (II):



na qual R_1' é um derivado de ácido carboxílico activado; R_2' é alquilo C_{1-8} ; R_3' é um grupo de protecção de amina; e cada R_4' é hidrogénio; e subsequentemente, facultativamente ou se necessário

e por qualquer ordem apropriada, a conversão de R_2' em R_2 , a conversão de R_3' em R_3 , a interconversão de R_2 , a interconversão de R_3 e a formação de um sal farmacêuticamente aceitável.

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

3a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a redução selectiva ser efectuada por utilização de um agente de redução de boro-hidreto.

4a - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o agente de redução de boro-hidreto ser boro-hidreto de sódio.

5a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que R_2 é hidrogénio ou metilo.

6a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que R_3 é hidrogénio, acetilo ou 9-fluorenilmetoxycarbonilo.

7a - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por se preparar um composto de fórmula (I), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que R_2 é hidrogénio ou metilo e R_3 é hidrogénio, acetilo ou 9-fluorenilmetoxycarbonilo.

8a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se prepararem :

N-acetil-16-descarboxi-16-hidroxi-metil-13-O-metil-anfotericina B;

N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-16-descarboxi-16-hidroxi-metil-13-O-metil-anfotericina B;

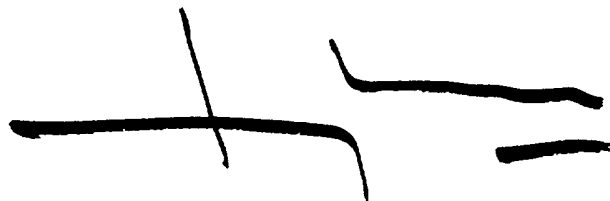
N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-16-descarboxi-16-hidroxi-metil-metil-anfotericina B;

16-descarboxi-16-hidroxi-metil-metil-anfotericina B; ou

16-descarboxi-16-hidroxi-metil-13-O-metil-anfotericina B;

9a - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, útil para o tratamento de infecções fúngicas, 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 CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA