

DESCRICAÇÃO  
DA  
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.877

REQUERENTE: MAYOLY-SPINDLER, francesa, com sede em 6,  
Avenue de l'Europe, BP 51-78401 Chatou,  
França e MICHEL SEMAN, francesa, residente  
em 16, Boulevard Voltaire, 75011 Paris,  
França,

EPÍGRAFE: "Processo para a preparação de novos derivados  
solúveis e não tóxicos de macrólidos poliéni-  
cos básicos e de composições farmacêuticas que  
os contêm"

INVENTORES: Jean-François Nicolay,

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

França, 14.11.1989, sob o Nº 89 14922

MAYOLY-SPINDLER e MICHEL SEMAN

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS SOLÚVEIS E NÃO  
TÓXICOS DE MACRÓLIDOS POLIÉNICOS BÁSICOS E DE COMPOSIÇÕES  
FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

A presente invenção diz respeito a um processo para a preparação de novos derivados solúveis e não tóxicos de macrólidos poliénicos básicos, e particularmente de novos 1-amino-1-desoxicetoses, e de composições farmacêuticas que os contêm.

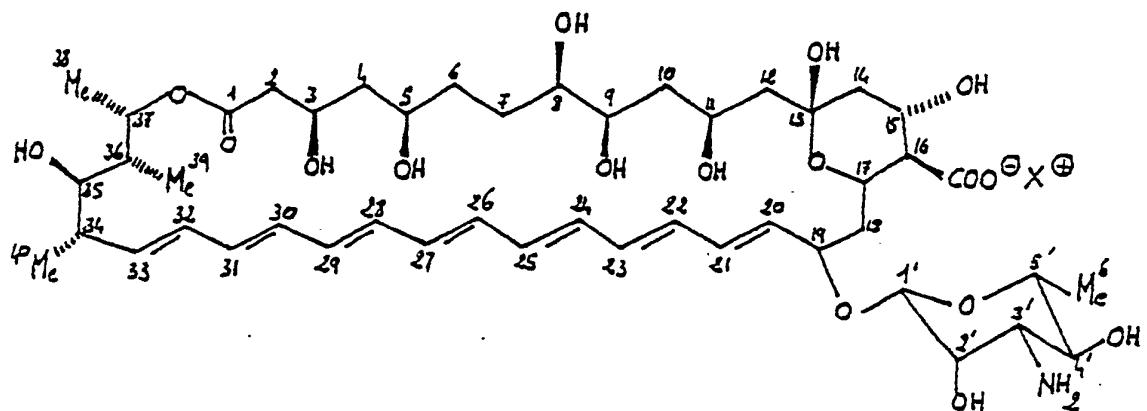
Os macrólidos poliénicos constituem uma classe de antibióticos antifúngicos que apresentam um largo espectro de acção sobre fungos e leveduras patogénicas para o homem. Isto é, particularmente verdade para a Anfotericina B (AmB), antifúngico de acção fungistática e fungicida de largo espectro : "Candida albicans", "Coccidioides immitis", "Sporotrichum", "Cryptococcus neoformans", "Histoplasma", "Blastomices", "Rhizopus orizae", "Aspergillus niger", etc.. São ainda apesar da introdução dos imidazóis, o medicamento mais eficaz para um bom número de afecções.

O AmB possui além disso propriedades imunomoduladoras no murganho e em certa medida no homem. Reforça igualmente a acção

-2-

de um certo número de medicamentos anti-cancerosos.

Contudo, pela sua natureza macrocíclica e pelo seu carácter anfotérico, o AmB que corresponde à fórmula geral



é pouco solúvel em água e tende a produzir micelas em solução aquosa. Além disso, a toxicidade do AmB em relação às células animais e em particular às células renais, linfócitos e eritrócitos, impõe importantes precauções de utilização em clínica. É em particular o caso para o tratamento das micoses profundas e sintémicas que devem ser tratadas mediante administração intravenosa.

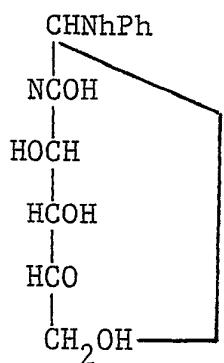
Estas considerações levaram numerosos investigadores a procurar derivados não tóxicos e mais solúveis. Preparou-se, assim, um grande número de derivados modificados quer ao nível da função ácido na posição C16, quer ao nível da função amina primária na posição C3'. Cita-se particularmente os trabalhos de:

- BRUZZESE e colab., "J. Pharm. Sci" (1975), 64, 462 : esterificação do grupo carboxilo;
- FALKOWSKI e colab., patente de invenção alemã Nº. 3013631 : amidificação do grupo carboxilo;
- WRIGHT Patente de invenção norte-americana Nº. 4 272 525 : esterificação do grupo carboxilo e substituição da amina em C3' por aminoácidos;
- SCHAFFNER e BOROWSKI, "Antib. & Chemo." (1961), II, 724 : acetilação da amina;
- SIPOS e KESELSKI Patente de invenção norte-americana Nº. 4 235 993: substituição do grupo amino por um grupo benzilo;
- KULBAKH e colab. Patente de invenção norte-americana Nº. 4 007 166: formação de um complexo N-metil-D-glucamina-macrólido;
- FALKOWSKI e colab. Patente de invenção norte-americana Nº. 4 195 172, patente de invenção britânica Nº. 1 387 187: glicosilação do grupo amina.

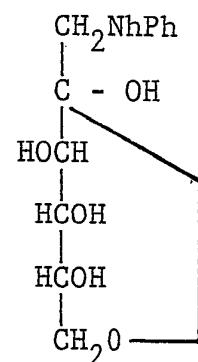
Tentou-se igualmente aumentar a solubilidade da Anfotericina B mediante adição de agentes tensio-activos ou pela formação de sais (Patente de invenção Europeia Nº. 31722). Infelizmente, todas estas tentativas levaram a derivados instáveis em solução ou a derivados que perderam as suas propriedades antibióticas.

A presente invenção tem, por consequência, por objectivo a obtenção de novos derivados de macrólidos poliénicos básicos e particularmente do AmB que respondem melhor às necessidades da

prática que os derivados anteriormente conhecidos, pelo facto de serem solúveis, pouco ou nada tóxicos, pelo facto de conservarem o carácter anfotérico do AmB e pelo facto de serem estáveis em meio aquoso. Sabe-se há já muito tempo (Amadori, 1925) que, em meio ácido, as glicosilaminas se transformam em 1-amino-1-desoxicetoses. Os mesmos compostos podem ser obtidos directamente a partir de uma ose e de uma amina na presença de um catalisador apropriado, de acordo com o esquema reaccional B :



N-fenil-D-glicosilamina



Esquema B

1-anilino-1-desoxi-D-fructose

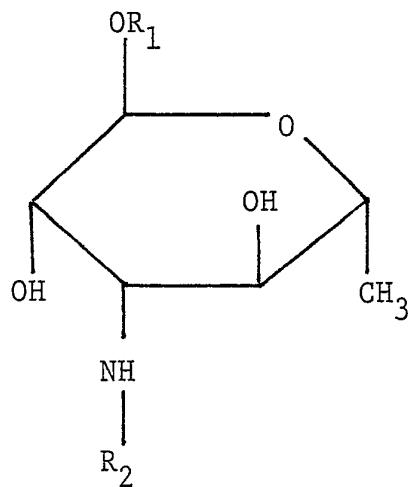
Este arranjo é dito de Amadori e está descrito mais particularmente em "Adv. Carbohydr. Chem." (1955), 10, 169. Na sua procura de derivados originais solúveis e pouco tóxicos, que conservem a sua estabilidade em solução aquosa, os inventores verificaram que, quando da condensação de um açúcar sobre a função amina primária da micosamina do macrólido, (que foi tentada e realizada por diferentes investigadores), a natureza

do açúcar condensado desempenhava um papel essencial sobre a solubilidade e a estabilidade dos derivados obtidos. Se os diferentes açúcares utilizados forem teoricamente todos capazes de formar uma glicosilamina com o AmB, parece que as propriedades de solubilidade, a estabilidade e as propriedades biológicas dependiam da aptidão da glicosilamina assim formada para efectuar um rearranjo da Amadori.

A presente invenção tem por objectivo novos derivados de macrólidos poliénicos básicos, caracterizados pelo facto de comportarem um macrólido poliénico básico N-substituído por um grupo 1-amino-1-desoxi-cetose, ele próprio substituído.

No sentido da presente invenção entende-se por grupo 1-amino-1-desoxi-cetose qualquer grupo resultante da condensação de um açúcar redutor, eventualmente substituído, sobre uma função amina, e apresentando uma funcionalidade beta-amino-cetona característica.

De acordo com um modo de realização preferido dos derivados de acordo com a presente invenção, estes correspondem à fórmula geral

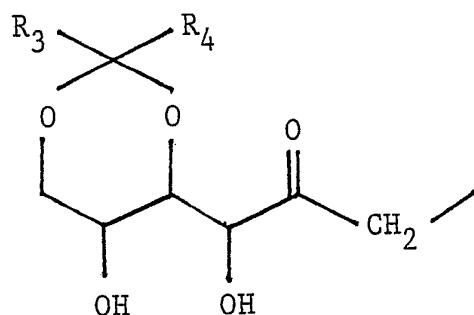


na qual :

$R_1$  representa a parte macrocíclica de um macrólido poliénico e

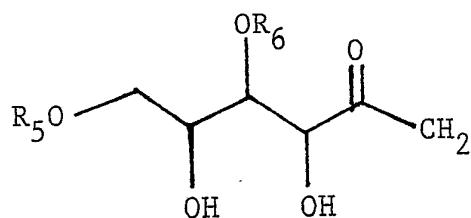
$R_2$  representa :

- uma estrutura correspondendo à fórmula geral



na qual  $R_3$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo metilo e  $R_4$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo metilo, triclorometilo, butilo terc., propilo, benzilo, fenilo, ou fenilo substituído por um ou vários grupos metoxi, nitro ou fosfato, ou então  $R_3$  e  $R_4$  representam elos de cadeia de um grupo cicloalquilo, ou então,

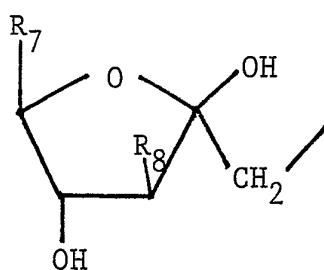
- uma estrutura de fórmula geral



na qual  $R_5$  e  $R_6$  representam grupos alquilo, arilo ou acilo,

ou então,

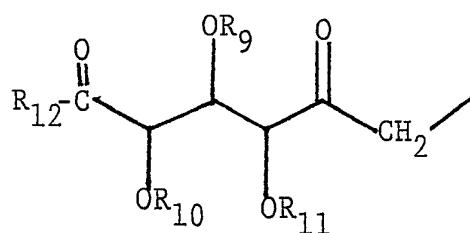
- uma estrutura correspondendo à fórmula geral



na qual  $R_7$  representa um grupo electroatractor, tal como um grupo carboxilo, éster, acilo, amida, nitrilo, tri-halogenometilo, ou um grupo heterocíclico, e  $R_8$  representa um grupo hidroxi, amina ou tiol,

ou então,

- uma estrutura de fórmula geral



na qual  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ , representam grupos alquilo, acilo ou arilo e  $R_{12}$  representa um grupo hidroxi, amina ou alcoxi,  
ou então,

- um di-holosido.

De um modo vantajoso, as 1-amino-1-desoxi-cetoses de acordo com a presente invenção, contrariamente às glicosilaminas descritas na técnica anterior citada antes que se hidrolisam rapidamente em água, são estáveis em meio aquoso neutro ou ácido e apresentam.

- propriedades de solubilização ou de dispersão em água muito satisfatórias,
- as propriedades biológicas da glicosilamina inicial,
- e uma citotoxicidade reduzida em relação à da glicosil inicial.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem obter-se sob a forma de sais mistos cuja natureza depende do catalisador escolhido para o rearranjo, ou da realização, consecutiva ao dito rearranjo, de uma etapa de deslocamento, por um outro sal, do sal misto obtido.

De acordo com um modo de realização preferido as 1-amino-1-desoxi-cetoses de acordo com a presente invenção encontram-se

sob a forma de sais do ácido de Brönsted utilizado para o rearranjo.

De acordo com uma modalidade particularmente vantajosa deste modo de realização, as 1-amino-1-desoxi-cetoses encontram-se sob a forma de sais mistos de oxalato e de amónio.

De acordo com um outro modo de realização preferido do objectivo de acordo com a presente invenção, as 1-amino-1-desoxi-cetoses encontram-se sob a forma de sais de N-metil-glucamina.

A presente invenção tem igualmente por objectivo um processo para a preparação dos derivados de macrólidos poliénicos básicos de acordo com a presente invenção, caracterizado pelo facto de no decurso de uma primeira etapa, se obter uma glicosilamina mediante condensação da função amina do macrólido sobre o carbono anomérico de um açúcar redutor, e pelo facto de, durante uma segunda etapa, se rearranjar a glicosilamina obtida, em meio ácido anidro, para se obter uma 1-amino-1-desoxi-cetose apresentando uma funcionalidade beta-amino-cetona característica

e pelo facto de se separar, no decurso de uma terceira etapa, a 1-amino-1-desoxi-cetose obtida do meio reaccional.

De acordo com um outro modo de realização do processo de acordo com a presente invenção, a etapa de condensação realiza-se

abriga da luz, sob atmosfera inerte e no seio de um dissolvente anidro, e a uma temperatura compreendida entre 35°C e 50°C.

De acordo ainda com um outro modo de realização do processo segundo a presente invenção, a etapa de rearranjo é induzida pela adição de um catalisador escolhido no grupo que compreende os ácidos de Brönsted, tais como, por exemplo, o ácido oxálico ou o ácido acético, e os catalisadores ditos "com metileno activo", tais como, por exemplo, o malonato de etilo ou a pentano-2,4-diona.

De acordo com uma modalidade preferida deste modo de realização, a separação do derivado obtido efectua-se mediante adição de uma solução aquosa de sulfato de amónio.

De acordo com uma outra modalidade preferida deste modo de realização, pode-se deslocar, com vantagem, o sal misto obtido com um outro sal. Suspende-se o sal misto em metanol e adiciona-se depois volume a volume uma solução aquosa contendo 1 a 3 equivalentes de ácido ou de base. A adição de 3 volumes de butanol permite, em seguida, eliminar a água azeotropicamente e recuperar o composto sob a forma cristalina.

A presente invenção tem igualmente por objectivo novos medicamentos, caracterizados pelo facto de conterem, como ingrediente activo, pelo menos um dos derivados de macrólidos de acordo

com a presente invenção.

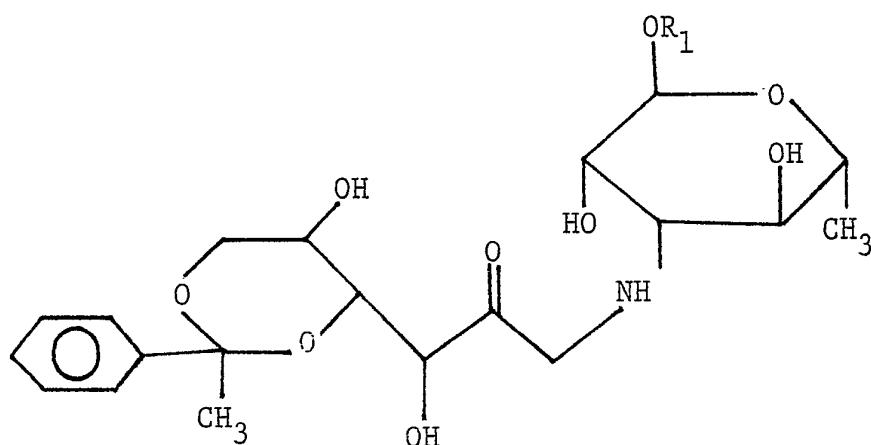
Além das disposições anteriores, a presente invenção compreende outras disposições, que sobressairão do complemento da descrição que se segue.

Deve entender-se, contudo, que estes exemplos de preparação, ensaios e estudos farmacológicos são dados unicamente a título ilustrativo do objectivo da presente invenção, não constituindo, por conseguinte, de maneira alguma, uma limitação.

EXEMPLOS DE PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE NACRÓLIDOS DE FÓRMULA GERAL I DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO.

EXEMPLO 1: Preparação de um sal misto de oxalato e de amónio de 1-amino-1-desoxi-4,6-O-metil-benzildeno-D-frutosil-AmB (AmB40G)

Fórmula IV : 1-amino-1-desoxi-4,6-O-metil-benzildeno-D-frutosil-AmB



Ao abrigo da luz, sob atmosfera inerte e em condições estritamente anidras, suspende-se o AmB em dimetilformamida (anidra, destilada recentemente). Sob agitação magnética, adicionam-se 1,5 equivalentes de 4,6-O-metil-benzilideno-D-glucopiranose, de uma só vez. Leva-se a temperatura da mistura reaccional a 38°C e deixa-se sob agitação durante um período compreendido entre 3 horas e 12 horas. Logo que a solução esteja perfeitamente limpida, adiciona-se o catalisador (um equivalente se se tratar de um ácido de Brönsted, tal como o ácido oxálico, 10% do volume para um "catalisador com metíleno activo") e aquece-se durante 24 horas. Arrefece-se então a mistura reaccional e precipita-se o 1-amino-1-desoxi-4,6-O-metil-benzilideno-D-frutosil-AmB mediante adição, sob agitação gota a gota, de uma solução a 10% de sulfato de amónio em água. A precipitação termina deixando a suspensão durante 2 horas a 4°C. Recupera-se então um composto cristalino amarelo claro [após centrifugação e eliminação do sobrenadante, que se lava 2 vezes com água (ou uma mistura de acetona/água) para eliminar o excesso de carbohidrato inicial e qualquer vestígio de dissolvente].

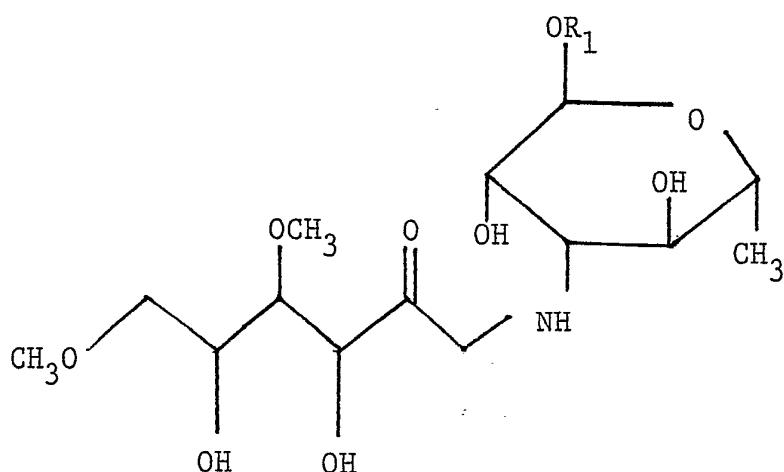
EXEMPLO 2: Preparação do sal de N-metil-glucamina de 1-amino-1-desoxi-4,6-O-metil-benzilideno-D-frutosil-AmB (AmB40F).

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função carboxílica deste derivado suspendendo o composto final do exemplo 1 em

metanol e mediante adição de 2 equivalentes de uma base poli-hidroxilada (N-metilglucamina) dissolvida em um volume de água equivalente ao do metanol. A mistura reaccional torna-se rapidamente limpida e adicionam-se então 3 volumes de um azeotropo (n-butanol). Evapora-se sob pressão reduzida até à eliminação do metanol e da água. O derivado recristaliza-se lentamente no butanol residual e deixa-se a suspensão a 4°C. Recupera-se o composto após centrifugação, lava-se 2 vezes com butanol e depois duas vezes com éter. Seca-se finalmente o derivado sob vazio intenso.

EXEMPLO 3: Preparação do sal misto de oxalato e de amónio de 1-amino-1-desoxi-4,6-dimetoxi-frutosil-AmB  
(AmB42G)

Fórmula V : 1-amino-1-desoxi-4,6-dimetoxi-frutosil-AmB



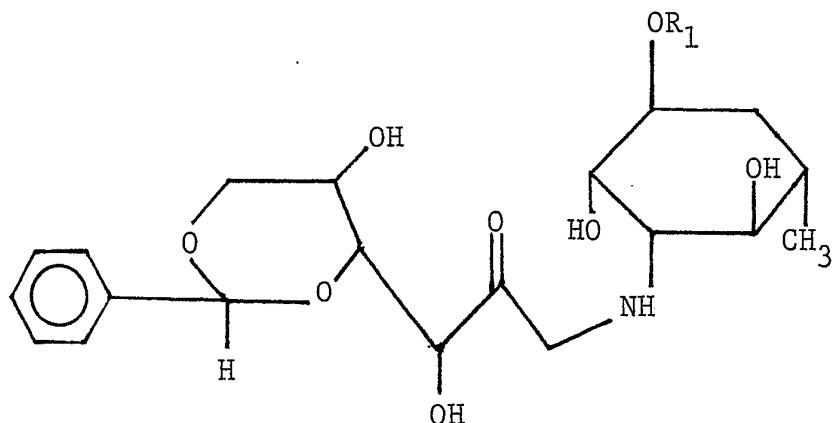
O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a exceção de o carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a 4,6-di-O-metil-D-glucopiranose.

EXEMPLO 4: Preparação do sal de N-metil-glucamina de 1-amino-1-desoxi-4,6-dimetoxi-frutosil-AmB (AmB42F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do exemplo 3 em metanol de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 5: Preparação do sal misto de oxalato e de amónio de 1-desoxi-1-amino-4,6-O-benzildeno-D-frutosil-AmB (AmB20G)

Fórmula VI : 1-desoxi-1-amino-4,6-O-benzildeno-D-frutosil-AmB.



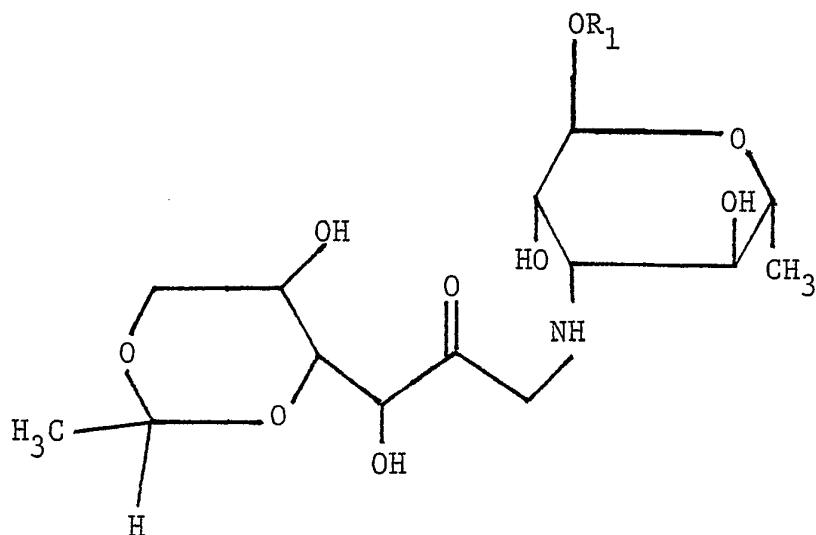
O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a excepção de o carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a 4,6-0-benzilideno-D-glucopiranose.

**EXEMPLO 6:** Preparação de sais de N-metil-glucamina de 1-desoxi-1-amino-4,6-0-benzilideno-D-frutosil-AmB (AmB20F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do Exemplo 5 em metanol de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

**EXEMPLO 7:** Preparação de sais mistos de oxalato e de amónio de 1-desoxi-1-amino-4,6-0-etilideno-D-frutosil-AmB (AmB22G)

**Fórmula VII :** 1-desoxi-1-amino-4,6-0-etilideno-D-frutosil-AmB.





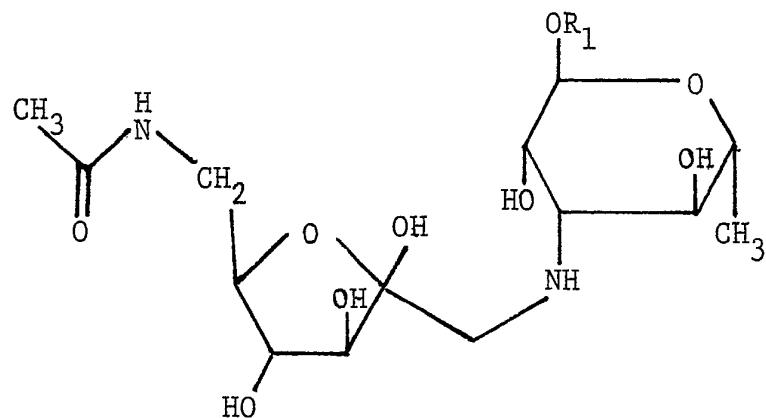
O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a excepção de o carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a 4,6-O-etilideno-D-glucopiranose.

**EXEMPLO 8:** Preparação do sal de N-metil-glucamina de 1-desoxi-1-amino-4,6-O-etilideno-D-frutosil-AmB (AmB22F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do Exemplo 7 em metanol de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

**EXEMPLO 9:** Preparação de sais mistos de oxalatos e de amónio de 6-desoxi-6-N-acetyl-1-desoxi-1-amino-frutosil-AmB (AmB23G)

**Fórmula VII :** 6-desoxi-6-N-acetyl-1-desoxi-1-amino-frutosil-AmB.



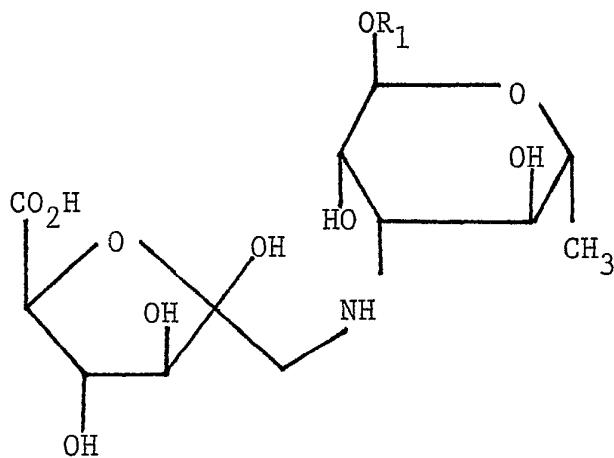
O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a exceção de o carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a 6-desoxi-6-N-acetil-D-glucopiranose.

EXEMPLO 10: Preparação de sais de N-metil-glucamina de 6-desoxi-6-N-acetyl-1-desoxi-1-amino-frutasil-AmB  
(AmB23F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do Exemplo 9 em metanol e depois de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 11: Preparação de sais mistos de oxalato e de amónio de 1-amino-desoxi-D-arabino-glucuronil-AmB  
mediante condensação da D-glucurono-6,3-lactona  
com o AmB (AmB17G)

Fórmula IX : 1-amino-desoxi-D-arabino-glucuronil-AmB



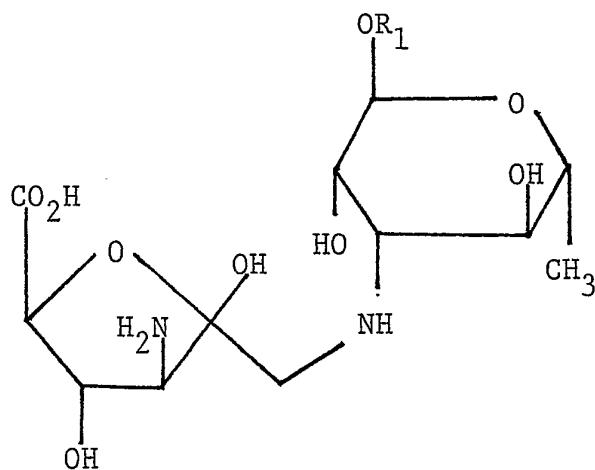
O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a exceção do carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a D-glucurono-6,3-lactona.

EXEMPLO 12: Preparação de sais de N-metil-glucamina de 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glucuronil-AmB mediante condensação da D-glucorono-6,3-lactona com o AmB (AmB17F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do Exemplo 11 em metanol e depois de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 13: Preparação de sais mistos de oxalato e de amónio de 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glucuronamidil-AmB (AmB12G)

Fórmula X : 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glucuronamidil-AmB



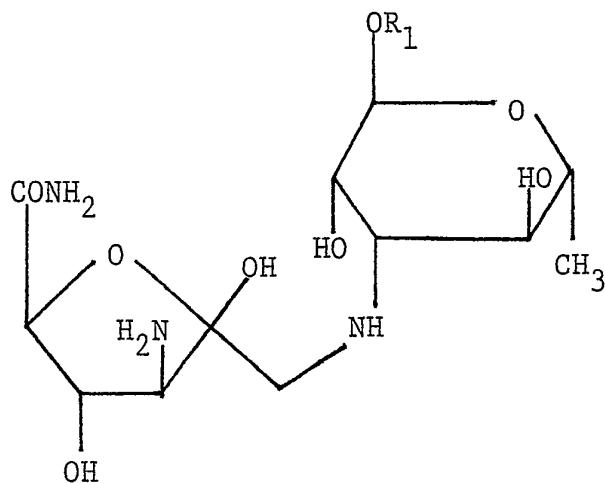
O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a excepção do carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a glucuronamida.

EXEMPLO 14: Preparação de sais de N-metil-glucamina de 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glucuronamidil-AmB (AmB12F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do Exemplo 13 em metanol e depois de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 15: Preparação de sais mistos de oxalato e de amónio da 1,3-di-amino-1,3-di-desoxi-D-arabino-glucuronamidil-AmB (AmB50G)

Fórmula XI : 1,3-di-amino-1,3-di-desoxi-D-arabino-glucuronamidil-AmB



O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao processo utilizado no Exemplo 1 com a excepção do carbo-hidrato ligado ao macrólido ser a 3-amino-3-desoxi-D-glucuronono-6,3-lactoma.

EXEMPLO 16: Preparação de sais de N-metil-glucamina de 1,3-diamino-1,3-di-desoxi-D-arabino-glucuronil-AmB  
(AmB50F)

Prepara-se o sal de N-metil-glucamina da função ácido deste derivado mediante suspensão do composto final do Exemplo 15 em metanol e depois de acordo com o processo descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 17: Preparação de sais mistos de oxalato e de amónio de 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glucuronil-AmB  
(AmB17G) mediante condensação do ácido glucurónico com o AmB.

O processo utilizado para a preparação deste sal é semelhante ao descrito no Exemplo 1 com a excepção de o carbo-hidrato ligado ao macrólido ser o ácido D-glucurónico. O composto obtido é idêntico ao do Exemplo 11.

RESUMO DE ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E TOXICOLOGICOS REALIZADOS  
PARA DEMONSTRAR AS PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DOS DERIVADOS DO  
AmB DE FÓRMULA GERAL I.

A) ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS

A.1: Estudo da eficácia antibiótica em meio líquido de derivados do AmB sobre diferentes leveduras.

A eficácia antibiótica foi testada de acordo com o método de inibição do crescimento em meio líquido (caldo Sabouraud) na presença de diferentes concentrações dos derivados estudados.

Fez-se crescer uma suspensão de leveduras no caldo de modo a obter-se cerca de  $1.10^2$  células/ml.

Semearam-se os tubos contendo as diferentes concentrações de substância antifúngica com uma mesma quantidade de células de leveduras e foram depois incubados a 28°C com agitação durante 18 horas. Para cada concentração de substância antifúngica preparam-se dois tubos idênticos.

Determina-se a inibição do crescimento fúngico de acordo com as diferentes concentrações para cada molécula mediante espectrofotometria a 620 nm e expressa-se em percentagem em relação a uma testemunha sem antifúngico.

A.2: Estudo da eficácia antibiótica em meio gelosado de derivados da Anfotericina B sobre "Aspergillus".

A actividade antibiótica foi testada de acordo com a técnica de difusão em meio gelosado (gelose Sabouraud).

A eficácia de cada molécula foi determinada pelo tamanho da zona de inibição do crescimento em torno de um disco de papel WHATMAN 3M embebido pela substância antibiótica com uma determinada concentração.

Preparou-se uma suspensão de esporos de "Aspergillus em caldo e semeou-se 0,2 ml desta suspensão na superfície do meio gelosado solidificado de modo a obter-se uma capa homogénea de crescimento. Uma vez efectuado o estendimento depositam-se os discos de papel WHATMAN 3M (diâmetro : 1 cm) sobre a superfície da gelose e embebem-se depois com 0,1 ml de substância antibiótica de diferentes concentrações.

As doses que inibem 50% do crescimento das espécies "S. cerevisiae"), "C. neoformans", "P. orbicular", "C. albicans", C. albicans B 2630" e as doses que dão uma zona de inibição do crescimento das espécies "A. flavus" e "A. fumigatus", de 1 cm em torno de um disco depositado sobre um meio de cultura sólido, determinadas nestes dois casos com os derivados 12, 17, 20, 22 e 23 das séries G e F, estão representadas nos Quadros 1 e 1 bis a

seguir. Estes quadros mostram que os derivados de AmB preparados pelo processo de acordo com a presente invenção conservam, por conseguinte, as propriedades antibióticas da molécula de onde provêm, o AmB.

### QUADRO 1

#### ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DOS DERIVADOS DO AmB SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS : COMPARAÇÃO DOS SAIS SOBRE OS DIFERENTES DERIVADOS DO AmB

CI 50 em Molaridade\*

DERIVADOS	"Saccharomyces cerevisiae"	"Cryptococcus neoformans"	"Pytirosporum orbiculare"
FUNGIZONA <sup>++</sup> AmB°	N.D. $5,4 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-8}$ $8 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$ $< 10^{-8}$
<u>Série F</u>			
AmB 12	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$6,5 \cdot 10^{-8}$	$9,6 \cdot 10^{-8}$
AmB 17	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-8}$
AmB 20	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$
AmB 22	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^{-7}$
AmB 23	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$7,6 \cdot 10^{-8}$
<u>Série G</u>			
AmB 12	$6,2 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-8}$	N.D.
AmB 17	$8,6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-8}$	N.D.
AmB 20	$1 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-8}$	N.D.
AmB 22	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	N.D.
AmB 23	$1 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	N.D.

QUADRO 1bis

ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DOS DERIVADOS DO AmB SOBRE  
DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS : COMPARAÇÃO DOS SAIS SOBRE  
OS DIFERENTES DERIVADOS DO AmB

CI 50 em Molaridade\*

Derivados	"Candida albicans"	"Candida albicans" B 2630	"Aspergillus flavus" **	"Aspergillus fumigatus" **
FUNGIZONA AmB •	1,9.10 <sup>-8</sup> 8.10 <sup>-8</sup>	8.10 <sup>-8</sup> 3,5.10 <sup>-7</sup>	N.D. 5.10 <sup>-5</sup>	N.D. 5.10 <sup>-5</sup>
<u>Série F</u>				
AmB 12	9.10 <sup>-8</sup>	2,4.10 <sup>-7</sup>	3.10 <sup>-4</sup>	8.10 <sup>-5</sup>
AmB 17	1,3.10 <sup>-7</sup>	N.D.	2.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-4</sup>
AmB 20	8,5.10 <sup>-8</sup>	1,5.10 <sup>-7</sup>	1,5.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-4</sup>
AmB 22	5,6.10 <sup>-7</sup>	N.D.	1,5.10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>-4</sup>
AmB 23	4.10 <sup>-7</sup>	N.D.	6.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-4</sup>
<u>Série G</u>				
AmB 12	1.10 <sup>-7</sup>	N.D.	9.10 <sup>-5</sup>	1.10 <sup>-4</sup>
AmB 17	1,2.10 <sup>-7</sup>	N.D.	9.10 <sup>-5</sup>	3,5.10 <sup>-5</sup>
AmB 20	1.10 <sup>-7</sup>	N.D.	6.10 <sup>-4</sup>	1,3.10 <sup>-4</sup>
AmB 22	9.10 <sup>-8</sup>	N.D.	9.10 <sup>-5</sup>	1.10 <sup>-4</sup>
AmB 23	1.10 <sup>-7</sup>	N.D.	5.10 <sup>-4</sup>	9.10 <sup>-5</sup>

Quadro 1 e 1bis

Série F : Catálise pelo ácido oxálico, sal de NMG

Série G : Catálise pelo ácido oxálico, sal misto de amónio e de oxalato

(\*) CI 50 = concentração que inibe 50% do crescimento dos germes

(°) AmB dissolvido em uma solução glicosada a 5%

(\*\*) concentração que dá uma inibição do crescimento de 1 cm em torno de um disco em meio sólido

(++) marca depositada.

B) ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

As propriedades tóxicas dos derivados de acordo com a presente invenção foram estudadas sobre glóbulos vermelhos humanos e murinos assim como sobre células linfóides do sangue periférico, da medula óssea, do Timo no Homem, sobre os linfócitos T e B esféricos do murganho e sobre duas linhas tumorais XG3 (murganho), Daudi (Homem).

B.1: Estudo da toxicidade sobre os glóbulos vermelhos.

Todas as soluções dos derivados do AmB de acordo com a presente invenção são preparadas extemporaneamente mediante diluição de 4 mg das moléculas em 100  $\mu$ l de solução de glucose a 5% e depois, após 15 minutos ao abrigo da luz, adicionam-se 100  $\mu$ l de água destilada estéril e completa-se com uma solução de glicose a 5% para se obter soluções-mães a 4 mg/ml. Para estudar comparativamente os efeitos do AmB, diluem-se 4 mg de FUNGIZONA em 1 ml de glucose a 5%.

As células preparam-se mediante deposição de 1 ml de sangue periférico colhido e diluído a meio sobre um Ficoll-hyopaque para eliminar os linfócitos, depois mediante centrifugação durante 20 minutos a 2000 rpm. Recupera-se o sedimento de glóbulos vermelhos, lava-se uma vez com cloreto de sódio a 0,9% depois duas vezes com cloreto de potássio 150 mM Tris HCl 0,5 mM, pH 7,4.

Faz-se depois uma suspensão a 1,25% em uma solução KCl 150 mM, Tris HCl 0,5 mM, pH 7,4 e distribuem-se 150  $\mu$ l por alvéolos assim como 50  $\mu$ l de cada uma das diluições de derivados, mais um alvéolo testemunha (solução de glicose a 5%).

Incubam-se então as células durante 1 hora e 30 minutos a 37°C em estufa húmida.

Para determinar a lise celular, doseia-se a hemoglobina mediante colheita de 100  $\mu$ l de sobrenadante em cada um dos alvéolos e mediante diluição em 1 ml de água destilada.

Calcula-se a concentração em hemoglobina mediante determinação da densidade óptica a 540 nm e tendo em conta a absorção dos derivados da Anfotericina B.

A DL<sub>50</sub> que é a dose que lisa 50% das hemáceas (obtém-se uma testemunha de lise de 100% com água destilada, obtém-se uma testemunha de lise de 0% com uma solução de glicose a 5%).

#### B.2: Estudo da toxicidade sobre as células nucleadas.

As soluções de derivados da Anfotericina B de acordo com a presente invenção preparam-se do mesmo modo que as mencionadas no paragrafo B.1.

Preparam-se as células mediante deposição de 20 ml de sangue diluído a 1/2 com cloreto de sódio 0,9%, sobre 10 ml de Ficoll-hypaque e mediante centrifugação durante 30 minutos a 2000 rpm. Recupera-se o anel de células e lava-se duas vezes com tampão PBS contendo 5% de soro fetal de vitela.

Preparam-se as células mediante suspensão de  $1,14 \cdot 10^6$  células/ml em RPMI 1640 contendo 2,5% de soro fetal de vitela e distribuição de 150  $\mu$ l por alvéolos. Adicionam-se 50  $\mu$ l de cada diluição dos derivados assim como uma testemunha (solução de glicose a 5%).

Incubam-se em seguida as células durante 1 hora e 30 minutos em uma estufa húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C ou à temperatura ambiente.

Para determinar a toxicidade dos derivados de acordo com a presente invenção, faz-se uma contagem celular na presença de azul de triptano e calcula-se a DL 50 (concentração de derivado que leva a uma mortalidade de 50%) em relação à testemunha (solução de glicose a 5%) para cada concentração de cada derivado.

Os quadros 2, 2 bis e 3, 3 bis a seguir mostram que os derivados preparados pelo processo de acordo com a presente invenção são muito menos tóxicos do que a Anfotericina B para as

células humanas, podendo isto variar de um derivado para outro.

O quadro 4 representa um estudo comparativo "in vitro" da toxicidade do AmB, do derivado não rearranjado e do mesmo derivado rearranjado utilizando diferentes catalisadores.

Em conclusão, estes estudos mostram que os derivados obtidos pelo processo de acordo com a presente invenção conservam as propriedades antibióticas AmB e que a sua toxicidade se perdeu totalmente ou diminuiu consideravelmente.

#### QUADRO 2

#### TOXICIDADE "IN VITRO" DOS DERIVADOS DO AmB SOBRE DIFERENTES CÉLULAS DE MURGANHOS : COMPARAÇÃO DOS SAIS SOBRE OS DIFERENTES DERIVADOS DO AmB

DL 50 em Molaridade

DERIVADOS	GLÓBULOS VER-MELHOS	CÉLULAS T DE GANG.+	CÉLULAS B DE GANG.+
FUNGIZONA <sup>++</sup>	$6 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
SERIE F			
AmB 12	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
AmB 17	$3 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
AmB 20	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
AmB 22	$9 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
AmB 23	$1,2 \cdot 10^{-5}$	N.D.	N.D.
SERIE G			
AmB 12	$2 \cdot 10^{-5}$	N.D.	N.D.
AmB 17	$1 \cdot 10^{-5}$	N.D.	N.D.
AmB 20	$4 \cdot 10^{-6}$	N.D.	N.D.
AmB 22	$1 \cdot 10^{-5}$	N.D.	N.D.
AmB 23	$4 \cdot 10^{-6}$	N.D.	N.D.

QUADRO 2bis

TOXICIDADE "IN VITRO" DOS DERIVADOS DO AmB SOBRE DIFERENTES  
CÉLULAS DE MURGANHOS : COMPARAÇÃO DOS SAIS SOBRE OS  
DIFERENTES DERIVADOS DO AmB.

DL 50 em Molaridade

DERIVADOS	TIMOCITOS	X 63**
FUNGIZONA <sup>++</sup>	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$
SERIE F		
AmB 12	$4 \cdot 10^{-6}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 17	$8 \cdot 10^{-6}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 20	$8 \cdot 10^{-6}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 22	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 23	$3 \cdot 10^{-6}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
SERIE G		
AmB 12	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-4}$
AmB 17	$5 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
AmB 20	$4 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
AmB 22	$5 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-4}$
AmB 23	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-4}$

SÉRIE F : catálise pelo ácido oxálico, sal de NMG

SÉRIE G : catálise pelo ácido oxálico, sal misto de amónio e de oxalato

(+) gang : ganglios para-aórticos e inguinais

(\*\*) X 63 : limfoma B murino

(++) marca depositada

QUADRO 3

TOXICIDADE "IN VITRO" DOS DERIVADOS DO AmB SOBRE DIFERENTES  
CÉLULAS HUMANAS : COMPARAÇÃO DOS SAIS DOS DIFERENTES  
DERIVADOS DO AmB

DL 50 em Molaridade

DERIVADOS	PBL	GLÓBULOS VER-MELHOS	MEDULA ÓSSEA
FUNGIZONA <sup>++</sup>	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-4}$
SERIE F			
AmB 12	$> 1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 17	$> 1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 20	$> 1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
AmB 22	$> 1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
AmB 23	$8 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	N.D.
SERIE G			
AmB 12	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	N.D.
AmB 17	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	N.D.
AmB 20	$3 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-5}$	N.D.
AmB 22	$3 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	N.D.
AmB 23	$8 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	N.D.

QUADRO 3BISTOXICIDADE "IN VITRO" DOS DERIVADOS DO AmB SOBRE DIFERENTESCÉLULAS HUMANAS : COMPARAÇÃO DOS SAIS DOS DIFERENTESDERIVADOS DO AmB

DL 50 em Molaridade

DERIVADOS	TIMOCITOS	DAUDI**
FUNGIZONA ++	$6 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
SERIE F		
AmB 12	$> 3 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 17	$> 3 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 20	$> 3 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 22	$> 3 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-3}$
AmB 23	N.D.	$> 1 \cdot 10^{-3}$
SERIE G		
AmB 12	N.D.	$> 3 \cdot 10^{-4}$
AmB 17	N.D.	$3 \cdot 10^{-4}$
AmB 20	N.D.	$5 \cdot 10^{-4}$
AmB 22	N.D.	$7 \cdot 10^{-4}$
AmB 23	N.D.	$3 \cdot 10^{-4}$

SÉRIE F : catálise pelo ácido oxálico, sal de NMG

SÉRIE G : catálise pelo ácido oxálico, sal misto de amónio e de oxalato

(\*\*) DAUDI : limfoma B humano

(++) marca depositada

QUADRO 4TOXICIDADE "IN VITRO" DO DERIVADO AmB SOBRE OS PBLs HUMANOS

## COMPARAÇÃO DE DIFERENTES CATALISADORES

DERIVADO	DL 50
FUNGIZONA <sup>++</sup>	$3,5 \cdot 10^{-5}$
Sem catalise <sup>(a)</sup> sal de NMG	$8 \cdot 10^{-5}$
Malonato dietílico <sup>(b)</sup> sal de NMG	$> 1 \cdot 10^{-3}$
Ácido oxálico <sup>(b)</sup> sal de NMG	$> 1 \cdot 10^{-3}$
Ácido acético <sup>(b)</sup> sal de NMG	$2 \cdot 10^{-4}$

(a) derivado não rearranjado

(b) catalisador utilizado para o rearranjoamento

(++ ) marca depositada

C) ESTUDO DA ESTRUTURA E DA ESTABILIDADE DOS DERIVADOS DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO:

C.1. Estudo analítico da estrutura

C.1.a Espectro U.V.

Os espectros U.V. dos derivados do AmB de acordo com a presente invenção mostram a conservação da estrutura poliénica do AmB.

A figura 1 representa em exemplo o espectro U.V. do AmB 12F.

C.1.b RMN do carbono

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos derivados de acordo com a presente invenção permitem confirmar a sua estrutura amadoriana.

O espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do AmB 12F é dado em exemplo, figura 2.

C.1.c : HPLC

Os espectros de HPLC em fase inversa do derivado AmB 12 rearranjado e do derivado correspondente não rearranjado são dados em exemplo na figura 3.

C.2. Solubilidade dos derivados do AmB de acordo com a presente invenção.

O AmB (utilizado como testemunha) ou os derivados obtidos são dissolvidos à temperatura ambiente em uma solução de glicose a 5%, até à saturação.

Nestas condições, o AmB é insolúvel.

O derivado AmB 17 é solúvel até uma concentração de 20 mg/ml.

O derivado AmB 20 é solúvel até uma concentração de 40 mg/ml.

O derivado AmB 12 é solúvel até uma concentração de 150 mg/ml.

C.3 : Estabilidade dos derivados do AmB de acordo com a presente invenção

C.3.a. : em solução

A degradação dos derivados de acordo com a presente invenção ao longo do tempo é seguida por HPLC. A figura 4 mostra os resultados obtidos (percentagem do derivado não degradado) para uma solução a 2,5 mg/ml de AmB 20 a :

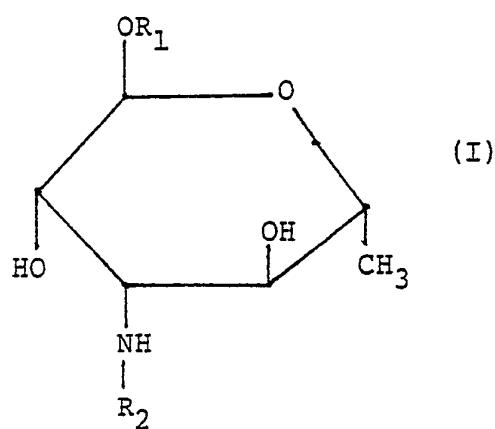
- 37°C
- ◆ temperatura ambiente
- 4°C

C.3.b sob a forma de pó

Quando se conservam os derivados de acordo com a presente invenção sob a forma de pó, estes permanecem estáveis durante vários meses.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de derivados de macrólidos poliénicos básicos, comportando um macrólido poliénico básico N-substituído por um grupo 1-amino-1-desoxi-1-cetose, ele próprio substituído, de fórmula geral



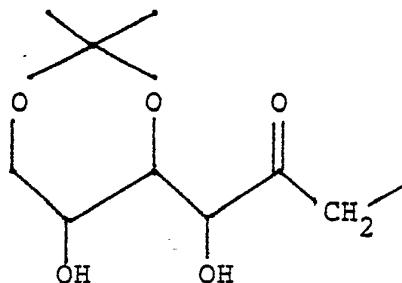
na qual:

$R_1$  representa a parte macrocíclica de um macrólido poliénico e

$R_2$  representa:

- uma estrutura de fórmula geral

$R_3$              $R_4$

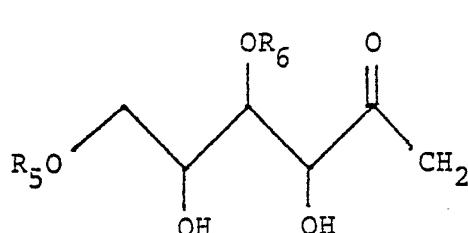


(a).

na qual  $R_3$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo metilo e  $R_4$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo metilo, triclorometilo, butilo terc., propilo, benzilo, fenilo ou fenilo substituído por um ou vários grupos metoxi, nitro ou fosfato, ou então  $R_3$  e  $R_4$  representam anéis de um grupo cicloalquilo,

ou então

- uma estrutura de fórmula geral

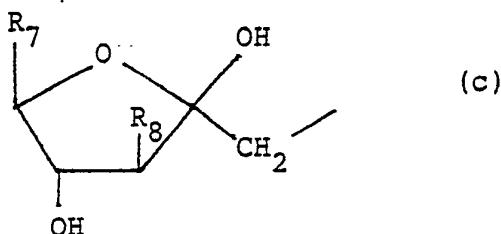


(b)

na qual  $R_5$  e  $R_6$  representam grupos alquilo, arilo ou

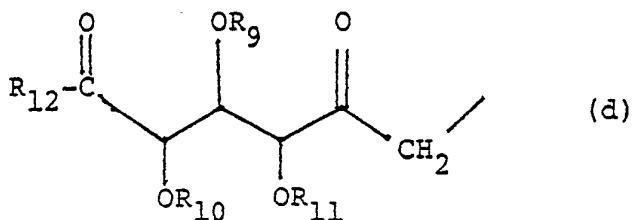
acilo,  
ou então

- uma estrutura de fórmula geral



na qual  $R_7$  representa um grupo electroatractor, tal como um grupo carboxilo, éster, acilo, amida, nitri-lo, tri-halogenometilo ou um grupo heterocíclico e  $R_8$  representa um grupo hidroxilo, amina ou tiolo  
ou então

- uma estrutura de fórmula geral



na qual  $R_9$ ,  $R_{10}$  e  $R_{11}$  representam, cada um, um radi-cal alquilo, acilo ou arilo e  $R_{12}$  representa um gru-po hidroxi, amina ou alcoxi,

ou então

- um di-holosido,

caracterizado pelo facto de efectuar as seguintes etapas na se-

guinte ordem:

a) uma etapa de condensação de um macrólido poliélico e de um açúcar redutor, eventualmente substituído, apto para efectuar um rearranjo de Amadori;

b) uma etapa de indução do rearranjo de Amadori com um catalisador escolhido no grupo constituído pelos ácidos de Brönsted e os catalisadores com metileno activo;

c) uma etapa para a separação do derivado rearranjado do meio reaccional.

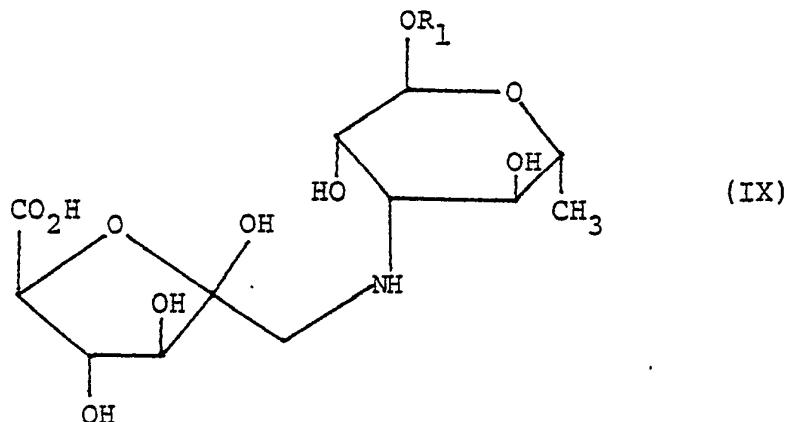
2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados de fórmula geral I sob a forma de sais de um ácido de Brönsted, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, para a preparação de compostos de fórmula geral I sob a forma de sais mistos de oxalato de amónio, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral I sob a forma de sais de N-metil-glucamina, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

5.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, para a preparação de derivados de fórmula geral I, em que o macrólido poliélico é a Anfotericina B, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondente-mente substituídos.

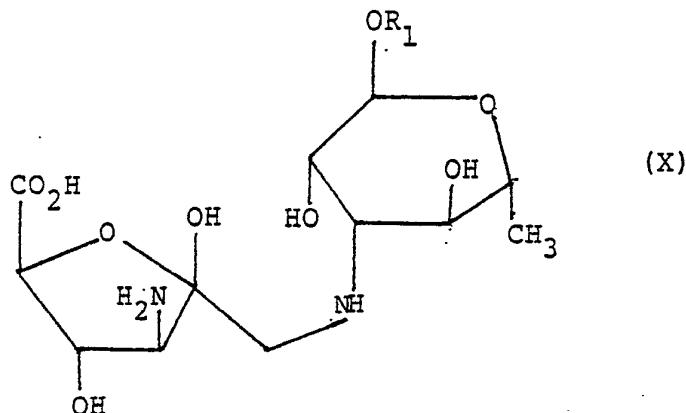
6.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, para a preparação de 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glu curonil-AMB de fórmula geral



ou do seu sal de N-metil-glucamina, ou do seu sal misto de oxalato de amónio, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondente substiuídos.

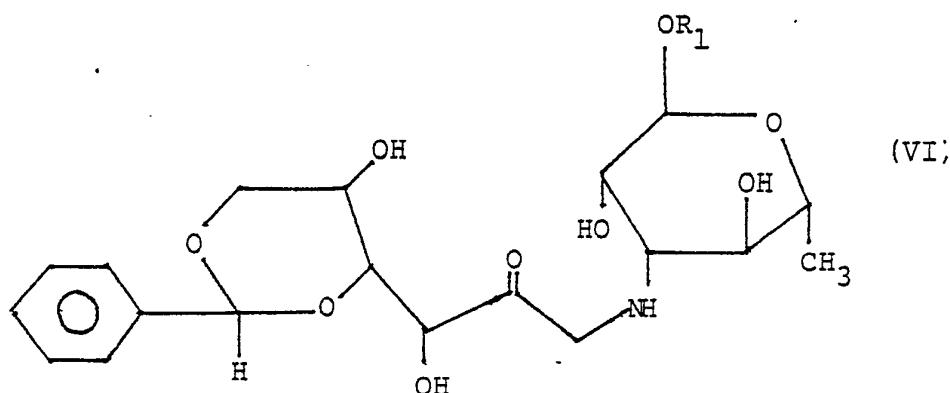
7.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, para a preparação de 1-amino-1-desoxi-D-arabino-glu coronamidil-AMB de fórmula geral

...



ou do seu sal de N-metil-glucamina, ou do seu sal misto de oxa-lato e de amónio, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

8.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, para a preparação de 1-desoxi-1-amino-4,6-O-benzilideno-D-frutosil-AMB de fórmula geral



ou do seu sal de N-metil-glucamina, ou do seu sal misto de oxa-lato e de amónio, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender além disso uma etapa para a preparação do sal de N-metil-glucamina do derivado rearranjado.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o açúcar redutor que sofre o rearranjo ser a D-glucopiranose ou um dos seus derivados.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o açúcar redutor que sofre o rearranjo ser o ácido  $\beta$ -D-glucurónico ou um dos seus derivados.

12.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade efectiva de um composto de fórmula geral I, preparado pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11, como ingrediente activo, com um excipiente apropriado, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

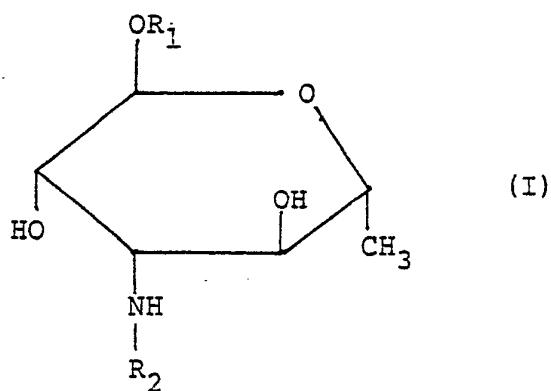
Lisboa, 13 de Novembro de 1990  
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

*Raphaële*

## R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS SOLÚVEIS E NÃO TÓXICOS DE MACRÓLIDOS POLIÉNICOS BÁSICOS E DE COMPOSIÇÕES FAR<sub>MACÊUTICAS</sub> QUE OS CONTEM"

Descreve-se um processo para a preparação de derivados de macrólidos poliénicos básicos, comportando um macrólido poliénico básico de N-substituído por um grupo 1-amino-1-desoxi-1-cetose, ele próprio substituído, de fórmula geral



caracterizado pelo facto de se efectuar as seguintes etapas, na seguinte ordem:

- a) uma etapa de condensação de um macrólido poliénico e de açúcar redutor, eventualmente substituído, apto para efectuar um rearranjo de Amadori;

- b) uma etapa de indução do rearranjo de Amadori com um catalisador escolhido no grupo constituído pelos ácidos de Brönsted e os catalisadores com metileno activo;
- c) uma etapa para a separação do derivado rearranjado do meio reaccional.

Os compostos preparados pelo processo de acordo com a presente invenção são úteis para a preparação de composições farmacêuticas.

Lisboa, 13 de Novembro de 1990  
Gabinete Oficial da Propriedade Industrial

*Mafhom'*

UV. Absorvência

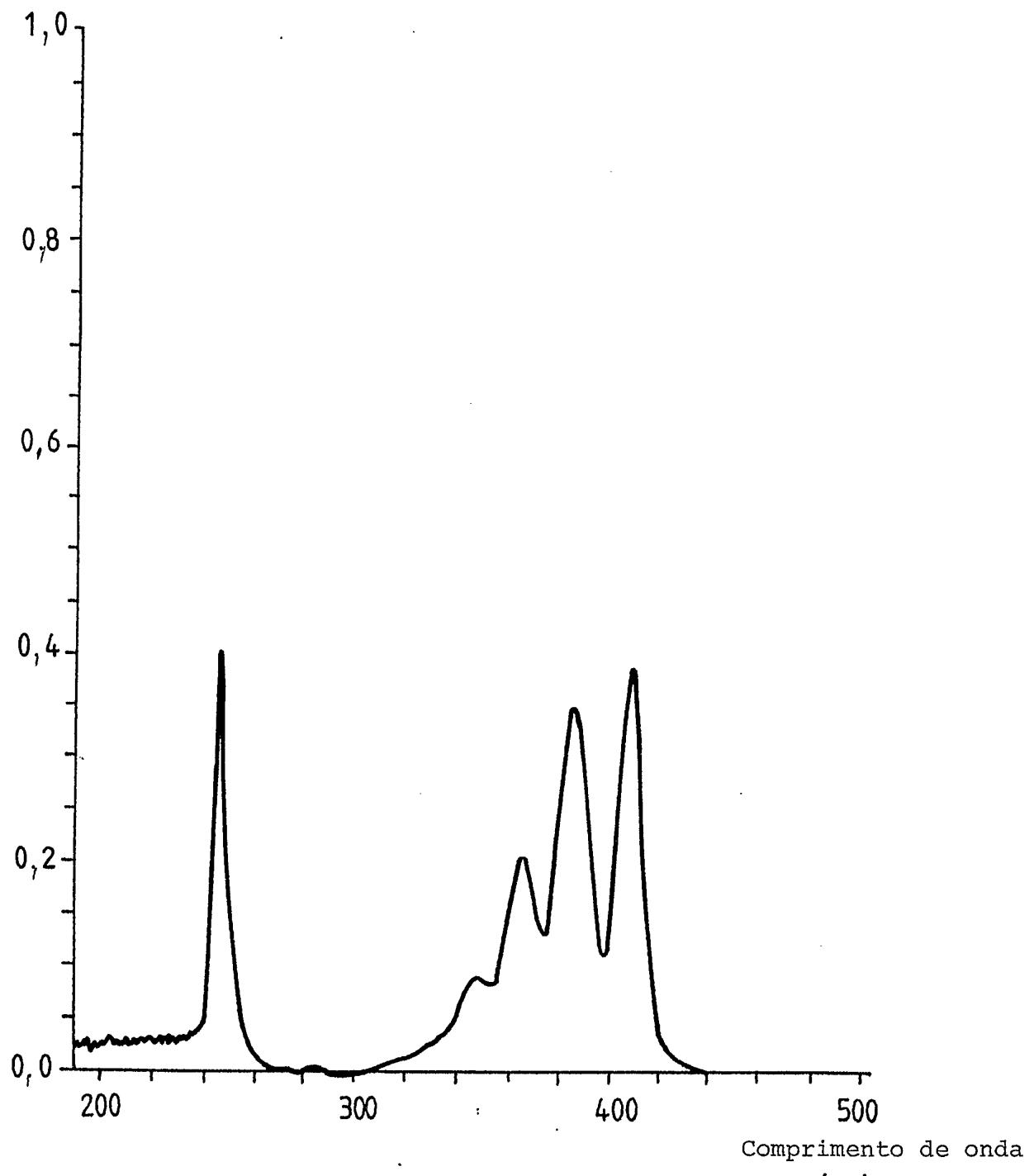
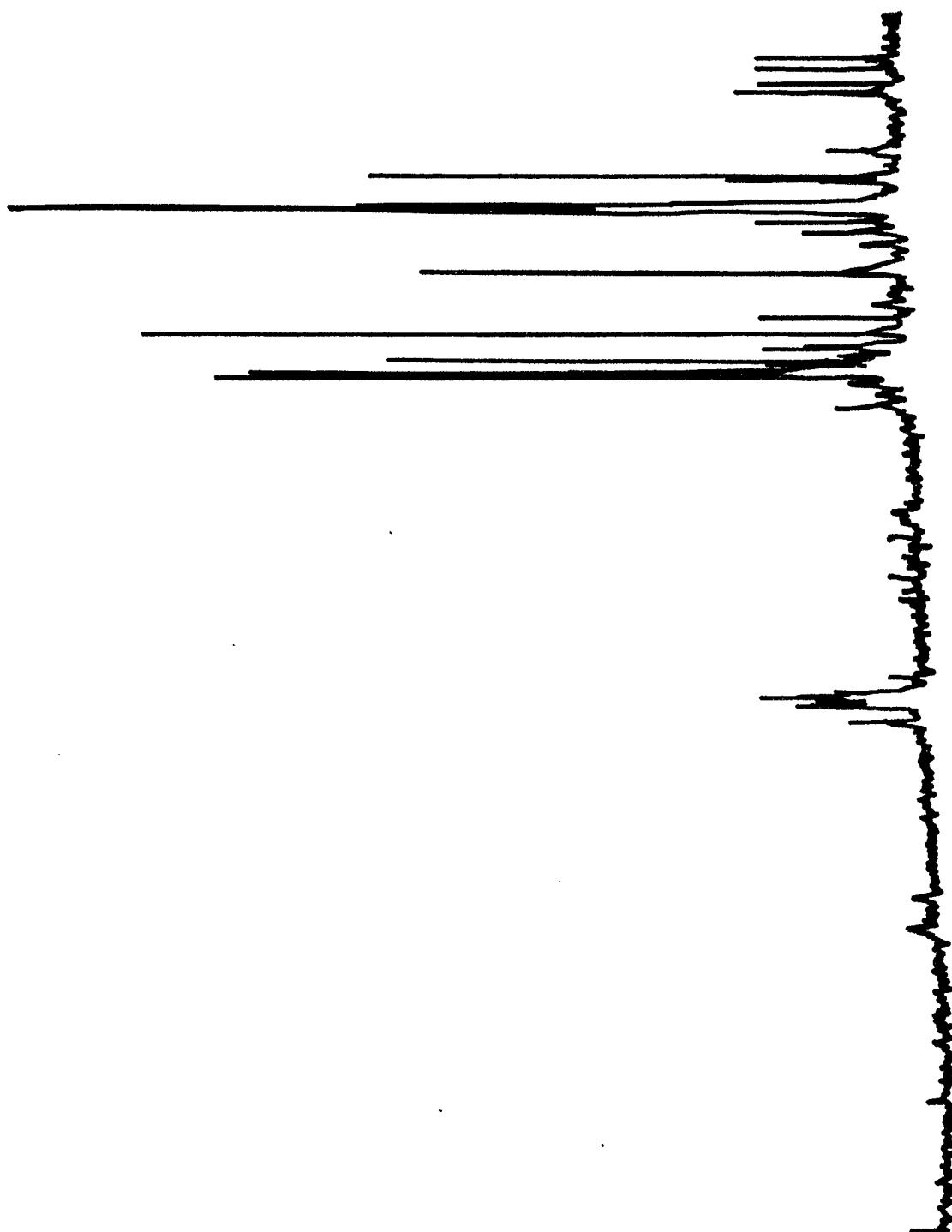


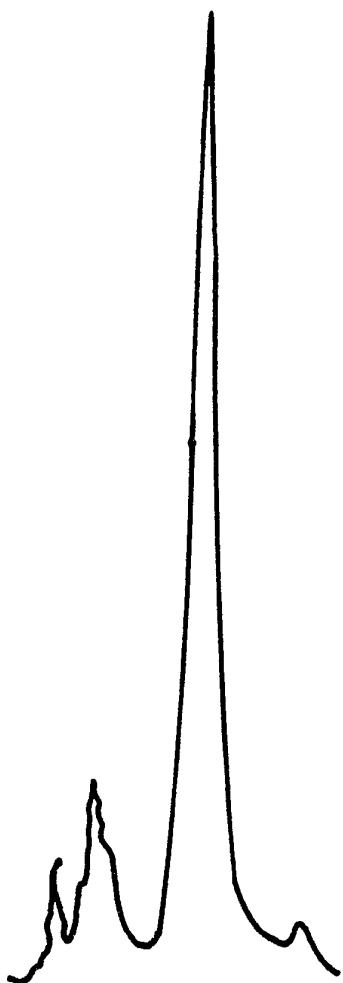
FIG.1

FIG.2



6

4,94



4,78

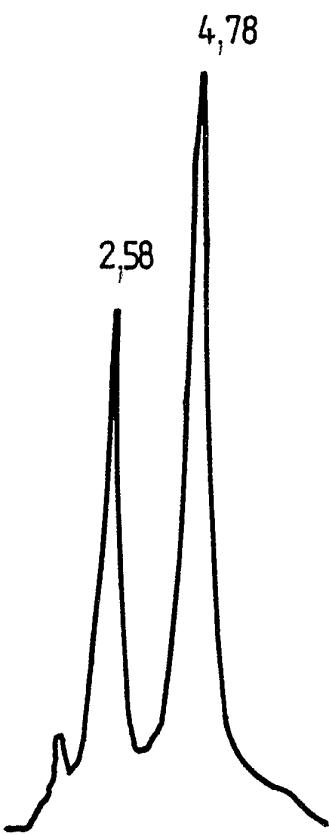


FIG.3a

FIG.3b

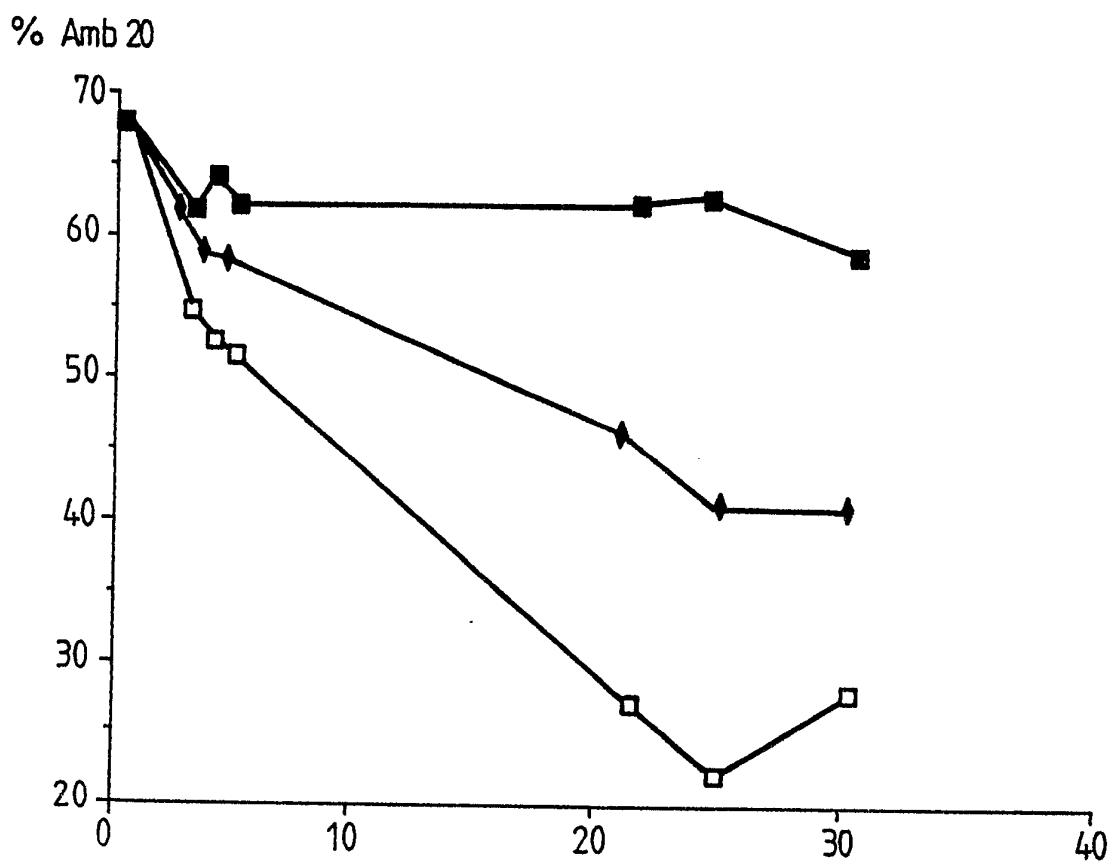


FIG.4