



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 119**

51 Int. Cl.:
C07K 7/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **99919261 .0**
86 Fecha de presentación : **22.04.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1073675**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2001**

54 Título: **Un procedimiento para la conversión de péptidos de la clase de las equinocandinas en sus análogos monodesoxi de C4-homotirosina.**

30 Prioridad: **23.04.1998 EP 98107397**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

73 Titular/es: **Aventis Pharma Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es: **Mukhopadhyay, Triptikumar;**
Jayvanti, Kenia y
Kumar, Erra, Koteswara, Satya, Vijaya

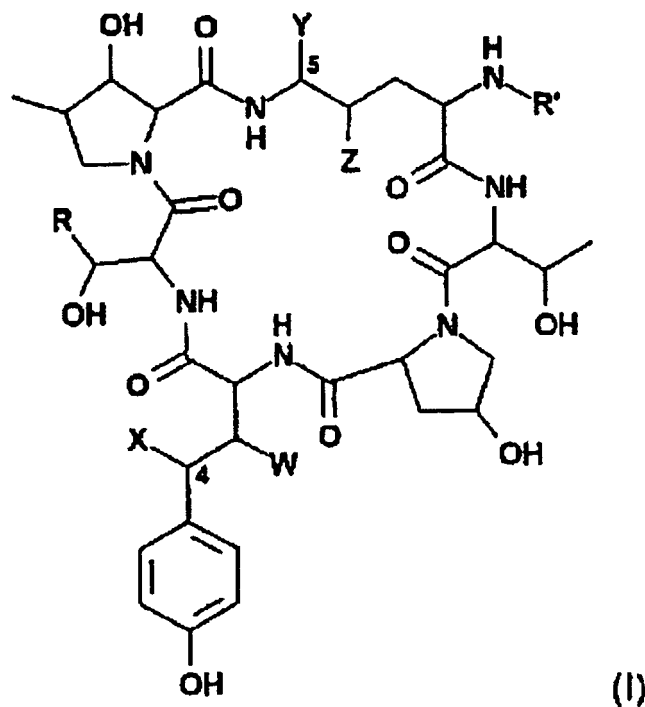
74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento para la conversión de péptidos de la clase de las equinocandinas en sus análogos monodesoxi de C4-homotirosina.

Esta invención se refiere a un procedimiento para la conversión de péptidos de la clase de las equinocandinas de la fórmula I



en la que W, X, Y, Z, R y R' son como se definen en la presente memoria más abajo:

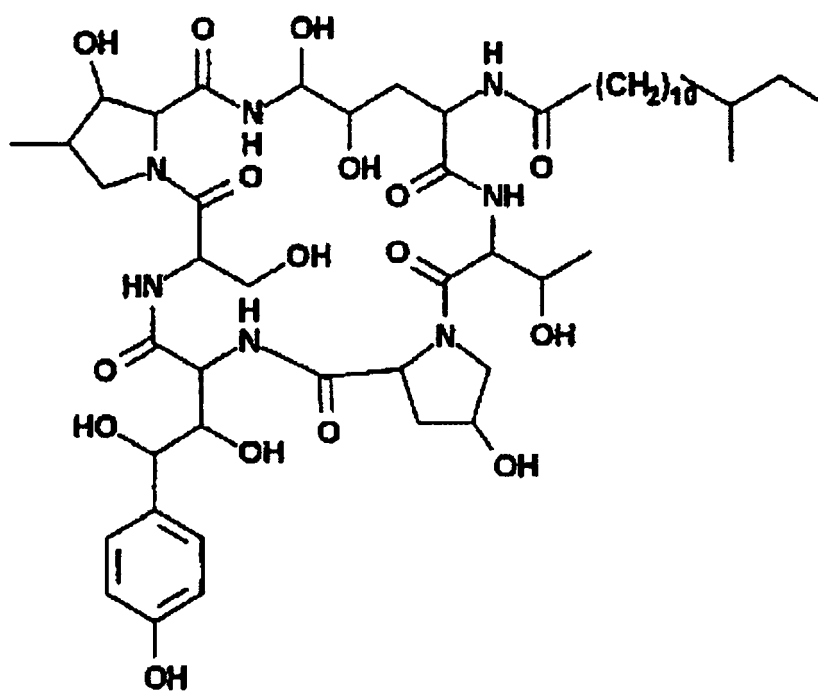
	W	X	Y	Z	R	R'
1. Equinocandina B	OH	OH	OH	OH	CH ₃	Linoleoil
2. Neumocandina A ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	10,12-Di-metil-miristoil
3. Neumocandina A ₁	H	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
4. Neumocandina A ₂	OH	OH	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
5. Neumocandina B ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
6. Neumocandina B ₂	OH	OH	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
7. Neumocandina C ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
8. Mulundocandina	OH	OH	OH	OH	H	12-Metil-tetradecanoil

ES 2 280 119 T3

a sus análogos monodesoxi de C4-homotirosina de la fórmula I, en la que W, X, Y, Z, R y R' son como se definen más abajo:

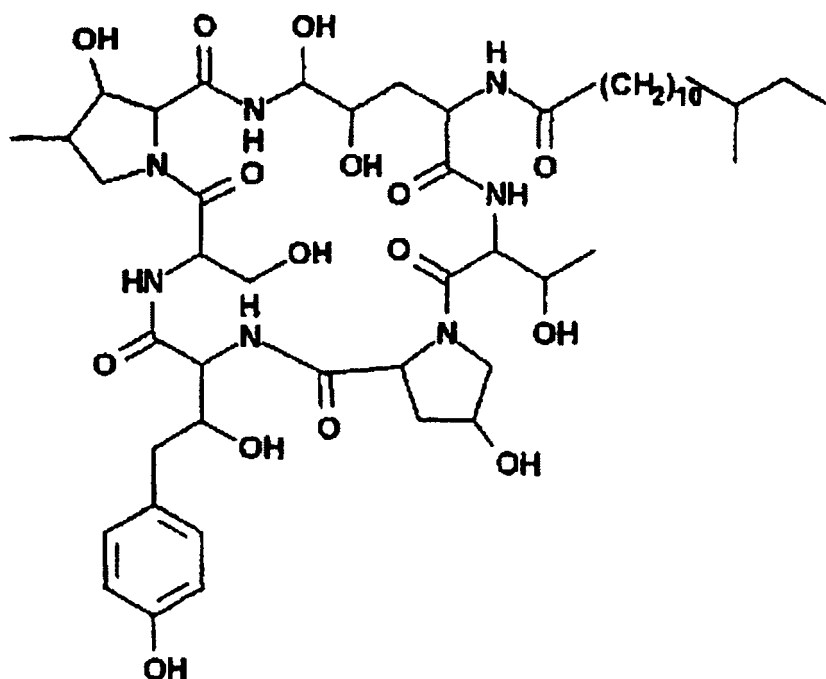
	W	X	Y	Z	R	R'
1. Desoxiequinocandina B (Equinocandina C)	OH	H	OH	OH	CH ₃	Linoleoil
2. Desoxineumocandina A ₀	OH	H	OH	OH	CH ₂ -CO-NH ₂	10,12-Dimetil-miristoil
3. Desoxineumocandina A ₁	H	H	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
4. Desoxineumocandina A ₂	OH	H	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
5. Desoxineumocandina B ₀	OH	H	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
6. Desoxineumocandina B ₂	OH	H	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
7. Desoxineumocandina C ₀	OH	H	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
8. Desoximulundocandin	OH	H	OH	OH	H	12-Metil-tetradecanoil

particularmente a un procedimiento para la conversión de mulundocandina (compuesto de la fórmula II)



(II)

a desoximulundocandina (compuesto de la fórmula III)



(III)

Los inhibidores de la síntesis de 1,3- β -glucano son agentes antifúngicos eficaces contra la *Candida albicans* y también el *Pneumocystis carini* un organismo oportunista responsable de una neumonía a menudo fatal entre los pacientes de VIH y otros anfitriones inmunodeprimidos. De todas las clases estructurales de inhibidores de la síntesis de 1,3- β -glucano, solamente las equinocandinas han recibido bastante atención [Ref: J. Med. Chem. 35, 198-200 (1992)]. Los péptidos de la clase de las equinocandinas son hexapéptidos cíclicos que tienen una cadena lateral lipófila.

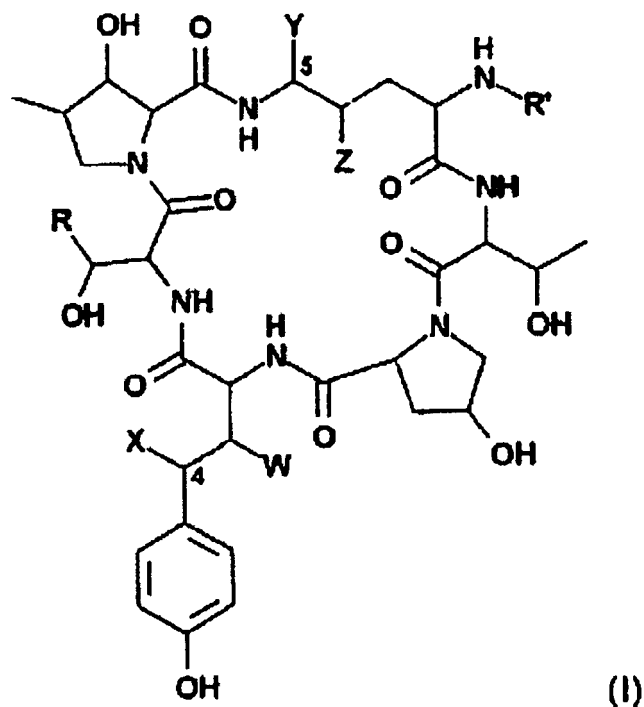
Se han divulgado varios métodos para la conversión de equinocandinas a los correspondientes desoxi análogos bajo condiciones ácidas [Ref: Tetrahedron Letts., 33, 4529-4532 (1992); solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 222.157 fechada el 4 de abril de 1994]. Los métodos anteriormente mencionados implican la reducción selectiva del grupo hidroxilo de C4-htyr (homotirosina) de las equinocandinas a sus monodesoxi análogos con protección previa/desprotección del grupo hidroxilo de C5-Orn (ornitina) igualmente fácil.

Otro método implica el uso de triacetoborohidruro como agente reductor en ácido trifluoroacético sin la necesidad de medidas de protección/desprotección (documento EP535959, fechado el 7 de abril de 1993).

La mulundocandina [J. Antibiotics, 40, 275-280 y 281-289 (1987)] y la desoximulundocandina [patente de India N° IN 169830; J. Antibiotics, 45, 618-623 (1992)] que tienen propiedades antifúngicas se aislaron a partir del *Aspergillus sydowii* (Bainier y Sartory) Thom y Church var. Nov. Mulundensis Roy (cultivo n° HIL Y-30462). Se encontró que la desoximulundocandina posee una actividad antifúngica mejor que la mulundocandina. Sin embargo, la producción de desoximulundocandina durante la fermentación fue 200 veces menor que la de la mulundocandina.

Hemos descubierto mediante investigación y experimentación exhaustivas que los péptidos de la clase de las equinocandinas de la fórmula I se pueden convertir a los correspondientes análogos monodesoxi de C4-htyr, particularmente la mulundocandina a desoximulundocandina bajo condiciones neutras. Por consiguiente, el objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la conversión de péptidos de la clase de las equinocandinas de la fórmula I a los correspondientes análogos monodesoxi de C4-homotirosina, particularmente la mulundocandina (compuesto de la fórmula II) a desoximulundocandina (compuesto de la fórmula III).

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para la conversión de péptidos de la clase de las equinocandinas de la fórmula I



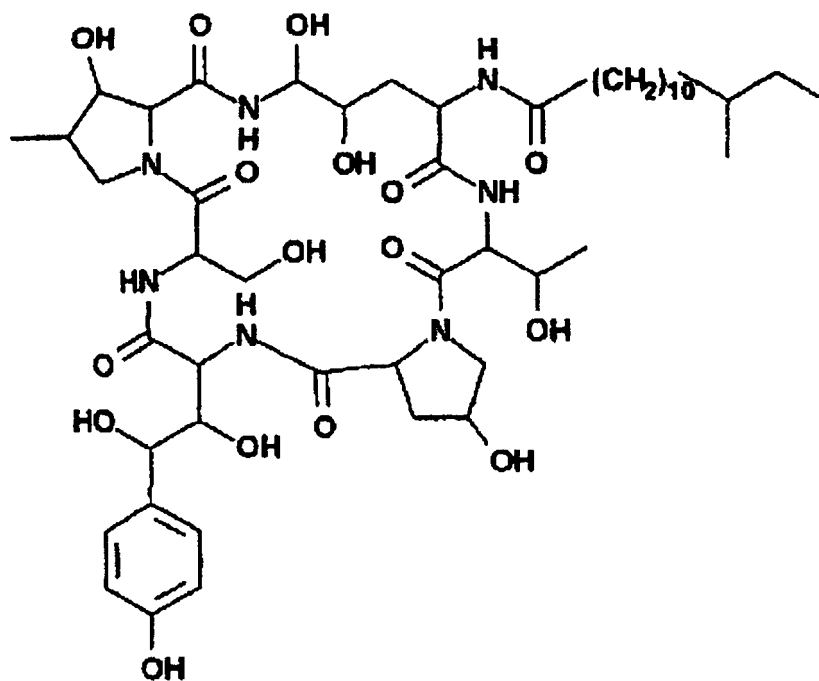
en la que W, X, Y, Z, R y R' son como se definen en la presente memoria más abajo:

	W	X	Y	Z	R	R'
1. Equinocandina B	OH	OH	OH	OH	CH ₃	Linoleoil
2. Neumocandina A ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	10,12-Dimetil-miristoil
3. Neumocandina A ₁	H	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
4. Neumocandina A ₂	OH	OH	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
5. Neumocandina B ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
6. Neumocandina B ₂	OH	OH	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
7. Neumocandina C ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
8. Mulundocandina	OH	OH	OH	OH	H	12-Metil-tetradecanoil

a sus análogos monodesoxi de C4-homotirosina de la fórmula I, en la que W, X, Y, Z, R y R' son como se definen más abajo:

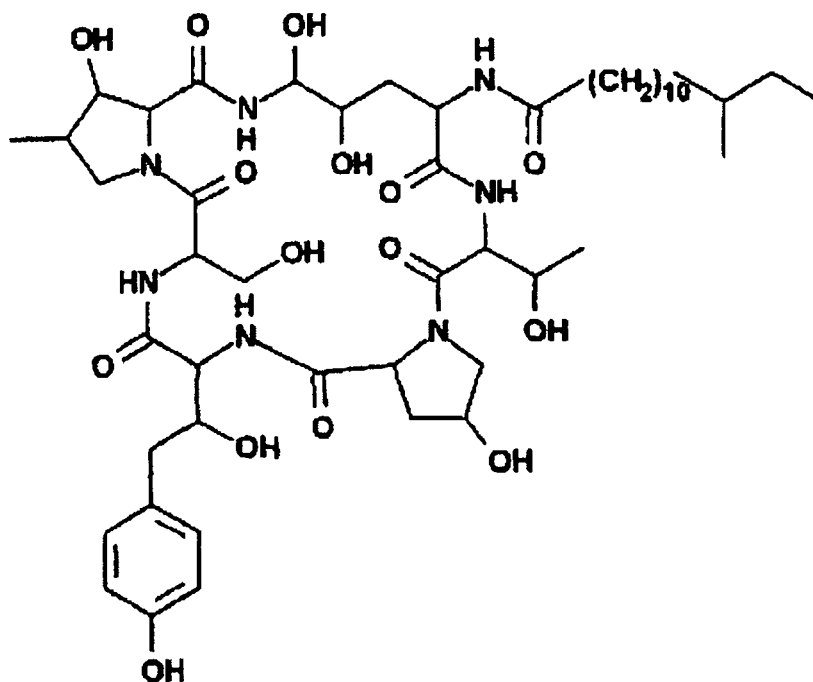
	W	X	Y	Z	R	R'
1. Desoxiequinocandina B (Equinocandina C)	OH	H	OH	OH	CH ₃	Linoleoil
2. Desoxineumocandina A ₀	OH	H	OH	OH	CH ₂ -CO-NH ₂	10,12-Dimetil-miristoil
3. Desoxineumocandina A ₁	H	H	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
4. Desoxineumocandina A ₂	OH	H	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
5. Desoxineumocandina B ₀	OH	H	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
6. Desoxineumocandina B ₂	OH	H	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
7. Desoxineumocandina C ₀	OH	H	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
8. Desoximulundocandin	OH	H	OH	OH	H	12-Metil-tetradecanoil

particularmente a un procedimiento para la conversión de mulundocandina (compuesto de la fórmula II)



(II)

a desoximulundocandina (compuesto de la fórmula III)



que consiste en una sola etapa de reducción selectiva por hidrogenólisis con Níquel Raney a pH 3-9 a temperatura ambiente del grupo hidroxilo de C4-htyr (homotirosina) de las equinocandinas a sus monodesoxi análogos particularmente bajo condiciones neutras sin protección previa/desprotección del grupo hidroxilo de C5-Orn (ornitina) igualmente fácil y la purificación del monodesoxi compuesto a partir de la mezcla bruta de reacción.

La conversión de las equinocandinas en sus monodesoxi análogos por reducción selectiva en C4-htyr se logra por hidrogenólisis con níquel Raney en disolventes tales como metanol, etanol, o dioxano a pH 3-9. Preferentemente, la reducción selectiva se lleva a cabo por hidrogenólisis con níquel Raney en etanol a pH 7 y temperatura ambiente en la proporción de 6,8 ml de níquel Raney por milimol de mulundocandina.

Los monodesoxi compuestos de la invención se pueden purificar, por ejemplo, a partir de la mezcla bruta de reacción como sigue:

Por fraccionamiento utilizando cromatografía en fase normal (usando alúmina o gel de sílice como fase estacionaria y eluyentes tales como éter de petróleo, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, metanol o sus combinaciones), cromatografía en fase inversa (usando gel de sílice de fase inversa como gel de dimetiloctadecilsililsílice, también llamada RP-18 o gel de dimetiloctilsililsílice también llamada RP-8 como fase estacionaria y eluyentes tales como agua, tampones tales como fosfato, acetato, citrato (pH 2-8) y disolventes orgánicos tales como metanol, acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano o una combinación de los disolventes), cromatografía de permeación sobre gel – utilizando resinas tales como “Sephadex LH20®” (Pharmacia Chemical Industries, Suecia), TSKgel Toyopearl HW (TosoHass, Tosoh Corporation, Japón) en disolventes tales como metanol, cloroformo o acetato de etilo o sus combinaciones o Sephadex G-10 y G-25 en agua; o por cromatografía en contracorriente utilizando un sistema eluyente bifásico preparado con dos o más disolventes tales como agua, metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, tetrahidrofurano, acetona, acetonitrilo, cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo éter de petróleo, benceno y tolueno. Estas técnicas se pueden utilizar repetidamente o se puede utilizar una combinación de las diferentes técnicas. Se prefiere la cromatografía en contracorriente (cromatografía líquido-líquido) utilizando un sistema eluyente bifásico sobre un serpentín ITO para la purificación de los compuestos de la invención.

El ejemplo experimental siguiente es ilustrativo de la presente invención pero no limitante de su alcance.

Ejemplo 1

Se agitó mulundocandina (220 mg, 2,2 mM) en etanol (8 ml) con 15 ml de níquel Raney W-2 (pH 7) en etanol (30 ml) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de dejar estar en reposo durante 15 minutos se decantó la disolución sobrenadante y el níquel Raney se lavó con 3 x 30 ml de etanol con agitación y se filtró. Las disoluciones

ES 2 280 119 T3

etanólicas combinadas se concentraron por destilación a una presión reducida de 60-70 mmHg a 35°C para obtener 160 mg (75%) de desoximulundocandina como un sólido ligeramente verde.

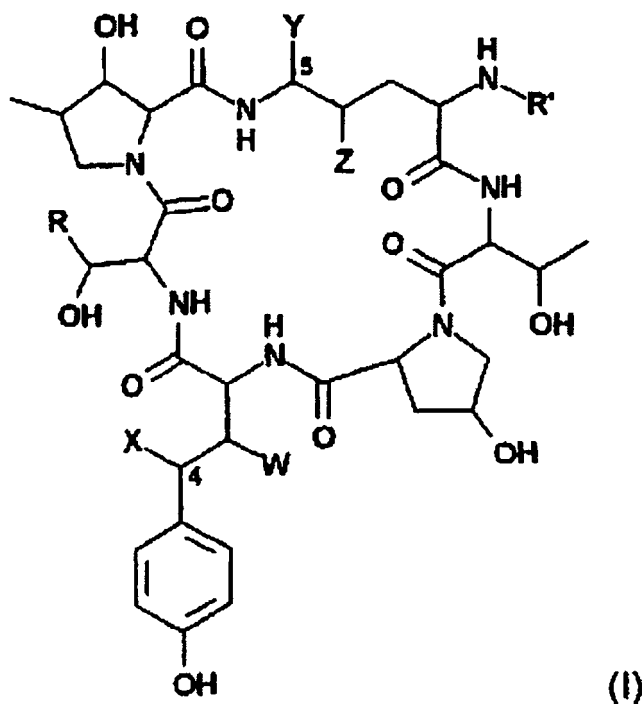
El producto bruto se purificó por cromatografía líquido-líquido en un serpentín ITO utilizando la capa superior de CH_2Cl_2 :MeOH:*n*-PrOH:H₂O como la fase estacionaria y la capa inferior como la fase móvil en un modo ascendente. Los serpentines (15 + 25 + 215 ml) se conectaron en serie y se mantuvo un caudal de 0,6 ml/min a una carrera de pistón de 60 y presión de 0,5 bares. La purificación de la desoximulundocandina se siguió tanto por la bioactividad contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* como por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) analítica [columna (10 x 0,4 cm + 3 x 0,4 cm) ODS-Hypersil, 10 μ ; fase móvil: CH₃CN : H₂O 50:50; caudal: 1 ml/min; longitud de onda: 220 nm). Se combinaron las fracciones (4,5 ml cada una) que contenían desoximulundocandina, se concentraron por destilación a una presión reducida de 60-70 mmHg a 35°C y se liofilizaron para rendir desoximulundocandina pura [65 mg (30% de rendimiento)]. También se recuperó, durante la purificación anterior de desoximulundocandina, mulundocandina sin reaccionar en 10% de rendimiento. La desoximulundocandina semi-sintética fue idéntica en todos los aspectos al compuesto aislado de forma natural y los datos físico-químicos se dan en la Tabla 1.

TABLA 1

Apariencia:	Polvo blanco
Punto de fusión:	170-172°C.
[α] _D :	-36,6° (c 0,25, MeOH)
HPLC TR:	4,42 min
FAB-MS (masas de Bombardeo rápido de átomos)	1014,7 (M + Na) ⁺
¹ H RMN (300 MHz, CD ₃ OD)	Figura 1 de los dibujos adjuntos
¹³ C RMN (75 MHz, CD ₃ OD)	Figura 2 de los dibujos adjuntos

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la conversión de péptidos de la clase de las equinocandinas de la fórmula I



en la que W, X, Y, Z, R y R' son como se definen en la presente memoria más abajo:

	W	X	Y	Z	R	R'
1. Equinocandina B	OH	OH	OH	OH	CH ₃	Linoleoil
2. Neumocandina A ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	10,12-Dimetil-miristoil
3. Neumocandina A ₁	H	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
4. Neumocandina A ₂	OH	OH	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
5. Neumocandina B ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
6. Neumocandina B ₂	OH	OH	H	H	CH ₂ -CONH ₂	"
7. Neumocandina C ₀	OH	OH	OH	OH	CH ₂ -CONH ₂	"
8. Mulundocandina	OH	OH	OH	OH	H	12-Metil-tetradecanoil

ES 2 280 119 T3

a sus análogos monodesoxi de C4-homotirosina de la fórmula I, en la que W, X, Y, Z, R y R' son como se definen más abajo:

	W	X	Y	Z	R	R'
5						
10						
15						
20						
25						
30						
35						
40						
45						
50						
55						
60						
65						

que consiste en una sola etapa de reducción selectiva por hidrogenolisis con Níquel Raney a pH 3-9 a temperatura ambiente del grupo hidroxilo de C4-htyr (homotirosina) de las equinocandinas a sus monodesoxi análogos particularmente bajo condiciones neutras sin protección previa/desprotección del grupo hidroxilo de C5-Orn (ornitina) igualmente fácil y la purificación del monodesoxi compuesto a partir de la mezcla bruta de reacción.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la Mulundocandina se convierte en Desoximulundocandina.

3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la reacción de reducción se lleva a cabo por hidrogenolisis con níquel Raney en etanol a pH 7 y temperatura ambiente.

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la hidrogenolisis se lleva a cabo en la proporción de 6,8 ml de níquel Raney por milimol de mulundocandina.

