

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 334**

51 Int. Cl.:

A01N 43/90 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2017** **PCT/EP2017/074606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2018** **WO18060321**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2017** **E 17783783 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021** **EP 3518677**

54 Título: **Composición que comprende una molécula bioactiva**

30 Prioridad:

28.09.2016 NL 2017545

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2022

73 Titular/es:

EUCARYO BEHEER B.V. (100.0%)
Hengstdalseweg 44
6523 EM Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

LITH VAN, WILHELMUS ANTONIUS MARIA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 906 334 T3

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

Composición que comprende una molécula bioactiva

5 La invención se refiere a un método para preparar una composición que contiene agua que comprende natamicina como una molécula bioactiva que comprende una funcionalidad ácida, a una composición obtenible con dicho método, a una composición que comprende la molécula bioactiva y al uso de dichas composiciones.

10 Las moléculas bioactivas que tienen una funcionalidad ácida son conocidas en la técnica. Dichas moléculas tienen en general poca solubilidad en agua, pero muestran actividad contra hongos, bacterias, pueden tener actividad anticancerosa o pueden ser una hormona vegetal. Algunos de estos compuestos pueden tener una estructura de anillo, que comprende una serie de dobles enlaces conjugados, grupos hidroxilo y un grupo micosamina; ejemplos de tales compuestos son natamicina, anfotericina B, nistatina y filipina. Ejemplos de hormonas vegetales son ácido gibberélico (GA3, GA4, GA7); otros compuestos son auxina (ácido indol-3-acético), ácido indol-3-butírico - ácido abscísico (S-ABA) y ácido betulínico. Todos los componentes tienen en común que tienen al menos un grupo ácido carboxílico y muestran bioactividad, y baja solubilidad en agua, por ejemplo, menos de 100 mg/l de agua.

20 Un ejemplo particular de una molécula bioactiva es la natamicina, también conocida como pimarinina, que es un agente antifúngico eficaz. Ejerce un amplio intervalo de actividad *in vitro* contra mohos y levaduras, particularmente de la especie *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium* y *Fusarium*. Después de su aislamiento en 1955, ha encontrado una aplicación generalizada en la conservación de alimentos, en particular productos de panadería, productos cárnicos, bebidas y productos lácteos (en particular queso). La natamicina parece poseer un espectro de actividad más amplio que muchos otros fungicidas permitidos para la aplicación alimentaria.

25 A pesar del potencial de la natamicina para combatir hongos, su uso en medicina clínica sigue siendo limitado. Esto se debe principalmente a la baja solubilidad de la natamicina en diversos disolventes, tanto acuosos como orgánicos, que son compatibles para la administración en humanos. Por ejemplo, la solubilidad en agua es de 30–50 mg L⁻¹, y en etanol es de 0,04–1,2 g L⁻¹; solo la fracción disuelta tiene actividad antifúngica. En formulaciones farmacéuticas de natamicina convencionales, tales como cremas para tratamientos tópicos de infecciones cutáneas, 30 la natamicina está presente en una forma cristalina predominantemente insoluble, lo que conduce a una baja biodisponibilidad de natamicina activa. Los intentos de aumentar la cantidad de natamicina disuelta en formulaciones tópicas produjeron con frecuencia un pequeño aumento de natamicina disuelta y una actividad antifúngica que aún era insuficiente para muchas aplicaciones. De hecho, otros intentos dieron como resultado cantidades significativamente más altas de natamicina disuelta, pero tales formulaciones presentaban el inconveniente de que la 35 actividad antifúngica no había aumentado en consecuencia (o incluso había disminuido), o de que fue necesaria la presencia de solubilizantes no deseados. Una aplicación médica exitosa secundaria de la natamicina está en el tratamiento de infecciones fúngicas corneales, y en la prevención de tales infecciones en los usuarios de lentes de contacto. Sin embargo, estas formulaciones son suspensiones en las que la cantidad de natamicina soluble y biológicamente activa es muy pequeña.

40 Es generalmente conocido que la natamicina puede disolverse en un disolvente acuoso con un pH alto. Dicho procedimiento puede usarse para purificar natamicina. En la patente CN102742581 este procedimiento se usa para poner en contacto eficazmente natamicina disuelta con hidroxipropilo β-ciclodextrina para producir un complejo de natamicina-ciclodextrina. Es conocido en la técnica que los complejos de inclusión/compuestos con natamicina 45 pueden producirse usando diferentes tipos de ciclodextrina (se descubrió que β-ciclodextrina (β-CD), hidroxipropilo β-ciclodextrina (HP β-CD) y γ-ciclodextrina (γ-CD) forman complejos de inclusión). La natamicina es la molécula huésped en dicho complejo de inclusión, siendo la forma y el tamaño de la forma de copa de parte de la molécula huésped críticos para poder formar dicho complejo. Sin embargo, la concentración de la natamicina en el complejo con ciclodextrina en agua sigue siendo baja, lo que limita la capacidad de uso de esta solución para diversas 50 aplicaciones.

55 Antonia Mattia y col.: “Natamycin (pimaricin)” En: “safety evaluation of certain food additives and contaminants Prepared by the Fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives (JECFA) - Series 48”, 2002, International Programme on Chemical Safety, vol. 48, páginas 49-72, describe datos de seguridad de producto de natamicina (pimaricina), tales como datos toxicológicos.

60 BRIK H: “NATAMYCIN”, ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES, 10, 1981, páginas 513-561, describe las propiedades químicas y físicas de la natamicina. RK MAHESHWARI: “Mixed-solvency approach” - Boon for solubilization of poorly water-soluble drugs”, ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 4, no. 1, 2010, página 60, describe la solubilización de medicamentos que tienen una solubilidad en agua reducida.

El documento WO 2011/133482 describe concentraciones herbicidas acuosas de ácidos carboxílicos auxínicos con irritación ocular reducida.

65 El documento US-2016/0251295 describe un proceso para la preparación de sales herbicidas de ácido carboxílico.

Por lo tanto, existe la necesidad de formulaciones farmacéuticas que tengan mayores cantidades de natamicina disuelta, sin comprometer la actividad antifúngica y/o sin componentes que resulten indeseables desde un punto de vista farmacéutico.

Además, cuando se toma por vía oral, poca o ninguna natamicina se absorbe desde el tracto gastrointestinal, lo que la hace inapropiada para el tratamiento de infecciones sistémicas. Los intentos de solubilizar natamicina en vehículos que son seguros para la administración parenteral en seres humanos aún no han sido exitosos. Por lo tanto, también existe la necesidad de formulaciones de natamicina eficaces que sean adecuadas para la aplicación parenteral.

La baja solubilidad de la natamicina también plantea problemas para su aplicación como conservante alimenticio. Aunque la aplicación de natamicina en forma cristalina puede ser eficaz en algunos casos para ese propósito, en realidad también existe la necesidad de composiciones de natamicina que comprendan formas más finamente divididas de natamicina sólida o natamicina que se disuelve completamente. Por ejemplo, la aplicación convencional de natamicina como una suspensión acuosa de cristales resulta indeseable teniendo en cuenta la obstrucción de las boquillas de pulverización y la formación de una distribución heterogénea cuando la suspensión se aplica sobre una superficie (*p. ej.*, de queso). Además, las formas más finamente divididas de natamicina o de natamicina completamente disuelta pueden permitir la aplicación de una dosis más baja de natamicina para obtener el mismo efecto antifúngico.

Una aplicación particular de la natamicina es la protección de productos agrícolas (en particular, material de propagación vegetal, tal como semillas y bulbos de flores) contra hongos. Sin embargo, la eficacia de la natamicina parece estar limitada en tales productos, posiblemente porque la natamicina sólida tiene un acceso limitado a los hongos que residen en grietas o por debajo de la superficie del producto agrícola. La natamicina que está completamente disuelta o que está presente como partículas más pequeñas puede ser, por lo tanto, más eficaz. Por otro lado, los fungicidas existentes, tales como tiram, pueden ser fitotóxicos cuando se aplican en concentraciones que son eficaces para combatir hongos. También los fungicidas de azoles generan resistencia en hongos objetivo, por ejemplo, en *Aspergillus fumigatus*, con 3 mutaciones separadas desde inicios de los 90. La natamicina no es propensa a causar un desarrollo de resistencia debido a su modo de acción directamente sobre el ergosterol de la membrana celular fúngica.

Por lo tanto, la baja solubilidad de la natamicina es un obstáculo que debe superarse para alcanzar una mayor eficacia en varias aplicaciones. Otra ventaja de una alta concentración de natamicina disuelta es que es posible preparar soluciones madre de natamicina.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es dar a conocer natamicina en una forma capaz de combatir eficazmente los hongos. En particular, se pretende dar a conocer una composición de natamicina que tenga una concentración más alta de natamicina que las composiciones conocidas, y cuya composición es estable durante un período de tiempo prolongado.

La composición que comprende natamicina con una alta concentración también se puede usar como soluciones madre para preparar composiciones que tienen una concentración más baja de natamicina, por ejemplo, diluyendo con agua.

En particular, un objetivo es dar a conocer una formulación eficaz de una molécula bioactiva, en particular, natamicina, que sea adecuada para aplicación médica, para la conservación de alimentos y/o productos agrícolas contra hongos.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que uno o más de estos objetivos se pueden alcanzar mediante un proceso para preparar una composición que comprende una molécula bioactiva que comprende las etapas de

a. Disolver una molécula bioactiva que tiene al menos un grupo ácido con una base con pH $\Rightarrow$ 11 para obtener una solución A

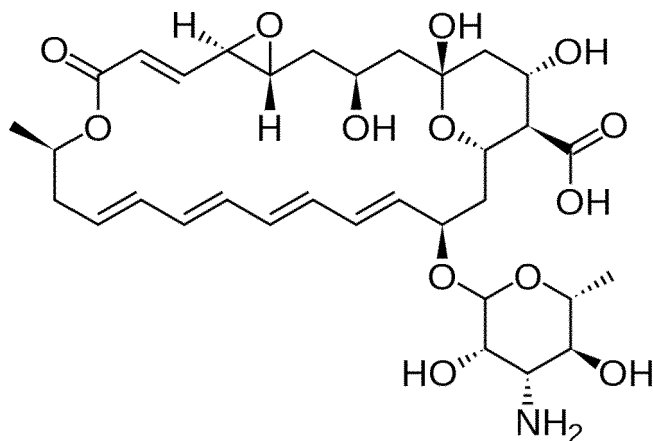
b. Neutralizar la solución A con un ácido para obtener la composición que comprende la molécula bioactiva que tiene un pH entre 6 y 9, en donde se añade PEG antes de la etapa de neutralización en caso de que la base y/o el ácido sean un compuesto inorgánico,

en donde la molécula bioactiva es natamicina, y en donde la base es una base orgánica seleccionada del grupo que consiste en hidróxido de colina, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, e hidróxido de tetrabutilamonio.

La molécula bioactiva puede estar presente como el componente químico puro conocido por la bibliografía, o puede estar presente como aducto con uno de los componentes añadidos al proceso o formado durante el proceso para preparar la composición según la invención. En particular, la molécula bioactiva puede estar presente como el producto de reacción del componente puro con la base (base inorgánica u orgánica) que puede dar un par iónico que tiene una mayor solubilidad en un entorno acuoso.

La expresión molécula bioactiva aquí y de aquí en adelante debe entenderse que comprende tanto la molécula bioactiva pura como cualquier aducto que puede formarse con la reacción con uno de los componentes de la composición.

- 5 La natamicina puede estar presente como la molécula química pura según la fórmula (I), o como un aducto con otros componentes, tal como la base, el ácido y/o el componente PEG opcional.



fórmula (I), natamicina.

- 10 Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que estos aductos pueden ser reversibles y pueden tener una solubilidad más alta que la natamicina neutra y proporcionar natamicina bioactiva con su dilución o aplicación en un sistema biológico.

- 15 El término natamicina aquí y de aquí en adelante debe entenderse que comprende tanto la natamicina pura como cualquier aducto que puede formarse con la reacción con uno de los componentes de la composición.

La molécula bioactiva es natamicina.

- 20 En general, la cantidad de molécula bioactiva varía entre el 0,1 y el 20 % en peso con respecto al peso total de la composición, más preferiblemente, entre el 1 y el 18 % en peso, el 3 y el 12 o, con máxima preferencia, entre el 4 y el 10 % en peso. Preferiblemente, la cantidad de agua varía entre el 5 y el 45 % en peso, y/o la relación de peso entre la molécula bioactiva y el agua es entre 1: 0,5 y 1: 12. Preferiblemente, la composición contiene PEG, preferiblemente, entre el 30 y el 80 % en peso de PEG, con un peso molecular promedio en número entre 200 y 30000, o entre 250 y 10000.

- 25 En caso de que la molécula bioactiva sea natamicina, los intervalos están típicamente entre el 0,1 y el 20 % en peso, más preferiblemente, entre el 1 y el 18 % en peso, el 3 y el 12 o, con máxima preferencia, entre el 4 y el 10 % en peso, como se describió anteriormente. Todos los porcentajes en peso se definen en relación con el total de la composición, a menos que se especifique de cualquier otra manera.

- 30 El agua está presente en el proceso según la invención. La cantidad de agua puede variar dentro de amplios intervalos. La cantidad de agua puede variar entre el 5 y el 80 % en peso, preferiblemente, entre el 5 y el 45 % en peso. Preferiblemente, se obtiene una composición que tiene un alto contenido de natamicina y una cantidad limitada de agua. En una realización preferida, la relación de peso entre natamicina y agua está entre 1: 0,5 y 1: 12, para asegurar una composición que tiene una alta cantidad de natamicina. Preferiblemente, la relación de peso entre natamicina y agua está entre 1:0,55 y 1:10, o entre 1:0,6 y 1:9.

Esta composición es concentrada y se puede diluir para su uso posterior.

- 40 En la primera etapa del proceso tiene lugar una desprotonación de la natamicina por reacción de la natamicina con una base.

- 45 El pH de la solución resultante es superior a pH 11, preferiblemente superior a pH 13. Se usa una base orgánica para preparar un aducto de natamicina que se disuelve en agua, y las bases orgánicas son hidróxido de colina, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, hidróxido de tetrabutilamonio.

Preferiblemente, la base orgánica es hidróxido de colina.

- 50 El hidróxido de colina se aplica preferiblemente como una solución en agua, por ejemplo, como una mezcla que contiene el 45 % en peso de hidróxido de colina y el 55 % en peso de agua o, por ejemplo, como una mezcla de un 25 % en peso de hidróxido de colina en un 75 % en peso de agua. Esta mezcla puede usarse como una mezcla de

disolventes para la natamicina, de manera que la composición total comprende entre el 25 y el 40 % en peso de hidróxido de colina.

El tiempo necesario para que la natamicina reaccione con el hidróxido de colina debe ser suficiente para obtener una solución transparente A. El tiempo varía típicamente entre 1 minuto y 1 hora, o entre 2 minutos y 30 minutos.

También se puede añadir hidróxido de colina en más de 1 etapa, por ejemplo, en 2 etapas consecutivas.

La base orgánica puede usarse para disolver la natamicina, pero la base también puede actuar como un solvente para la natamicina.

También se puede añadir PEG como un codisolvente para la natamicina después de la adición de la base a la natamicina. En tales casos, la cantidad de hidróxido de colina puede variar del 4 al 30 % en peso, por ejemplo, entre el 10 y el 25 % en peso con respecto al total de la composición.

Preferiblemente, el PEG es un polietilenglicol con un peso molecular promedio en número entre 200 y 30000. En una realización, se aplica PEG que tiene un peso molecular más bajo (por ejemplo, entre 200 y 1000, más preferiblemente, entre 220 y 800, o entre 250 y 600). En tales casos, es posible usar el PEG como un líquido y se obtienen composiciones que tienen excelentes propiedades.

En otra realización, se aplica PEG que tiene un peso molecular entre 1000 y 10000. En tales casos (especialmente con pesos moleculares más altos, por ejemplo, de al menos 5000, 6000 o de 8000 a 10000) se puede necesitar agua adicional para disolver el PEG de alto peso molecular. Los inventores descubrieron que, en tales casos, la natamicina puede estar presente como cristales dispersos que pueden disolverse fácilmente en la composición, produciendo una composición que tiene una concentración de natamicina disuelta casi constante: la composición contiene natamicina disuelta y natamicina cristalina. Cuando se toma natamicina disuelta de la composición, la natamicina cristalina puede disolverse para generar la concentración de natamicina semiconstante.

Las composiciones que tienen PEG de menor peso molecular (preferiblemente entre 200 y 1000) tienden a ser más estables en comparación con las composiciones que tienen PEG de mayor peso molecular.

La relación de peso entre natamicina e hidróxido de colina puede variar entre 1: 0,4 y entre 1:100, preferiblemente, entre 1:0,45 y 1:20, o entre 1:0,5 y 1:8. Las relaciones más bajas (por ejemplo 1:0,5-1:3) se aplican preferiblemente cuando también está presente PEG como disolvente, las relaciones más altas (por ejemplo, 1:3-1:100) se aplican en ausencia de PEG o cuando una cantidad limitada de PEG está presente (por ejemplo, entre el 0,1 y el 15 % en peso de PEG, con respecto al peso total de la composición).

La relación de peso entre hidróxido de colina y agua necesaria para disolver la natamicina es al menos 1,5, a efectos de tener suficiente líquido para disolver la natamicina. Cuando la cantidad (peso) de agua e hidróxido de colina es inferior a 1,5 veces el peso de natamicina, se obtiene una pasta o una sustancia muy viscosa que es menos adecuada para preparar la composición según la invención.

Si se añade, la cantidad de PEG puede variar entre el 0,5 y el 90 % en peso, preferiblemente entre el 20 y el 87 % en peso, o entre el 30 y el 80 % en peso.

Preferiblemente, el PEG se añade a temperatura elevada, preferiblemente, entre 30 y 60 °C. También es posible calentar el PEG antes de la adición de la mezcla de natamicina y el componente de base a una temperatura entre 40 y 85 °C, para llegar a una solución A que tiene una temperatura entre 30 y 60 °C. Una temperatura de la solución A inferior a 30 °C puede conducir a una composición que tiene una viscosidad mejorada, o incluso una consistencia similar a la pasta. Una temperatura superior a 80 °C puede conducir a una polimerización excesiva del PEG bajo la influencia de KOH, que preferiblemente debe evitarse.

En la segunda etapa, la mezcla de reacción se neutraliza a un pH entre 6 y 9 (preferiblemente, un pH entre 7 y 8) añadiendo un componente ácido. El componente ácido puede ser un ácido inorgánico, como por ejemplo una solución de HCl, ácido sulfúrico y otros ácidos fuertes, o el componente ácido puede ser un ácido orgánico. Preferiblemente, el componente ácido usado en la etapa b es un ácido orgánico.

Ejemplos de ácidos orgánicos son ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido málico, ácido butanoico, ácido hexanoico, ácido hidroxibutanodioico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido octanoico y ácido nicotínico. Preferiblemente, se usa ácido propiónico para la neutralización de la solución A, cuando se añade PEG a la composición.

En ausencia de PEG, o cuando solo se aplican cantidades bajas (por ejemplo, entre el 0,1 y el 15 % en peso) de PEG, preferiblemente, el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido propiónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico y ácido láctico.

La cantidad de ácido se determina por la cantidad de base añadida a la molécula bioactiva, para llegar a una solución que tiene un pH entre 6 y 9, preferiblemente, entre 6,5 y 8,5, con máxima preferencia, entre 7 y 8.

5 En caso de que el ácido sea un ácido inorgánico, se debe añadir PEG antes de la etapa de neutralización, como se explicó anteriormente. La etapa B de neutralización se realiza preferiblemente dentro de un tiempo de 1-60 minutos después de la adición de PEG, más preferiblemente, entre 2 y 30 minutos después de la adición de PEG, o entre 3 y 15 minutos después de la adición de PEG.

10 La cantidad de ácido se determina midiendo el pH de la composición resultante que comprende la molécula bioactiva. En general, la cantidad molar del ácido estará cerca de la cantidad molar de la base.

En una realización, la invención se refiere a un proceso para preparar composición que comprende natamicina que comprende las etapas de

15 a) Disolver del 0,1 al 20 % en peso de natamicina con una base orgánica disuelta en agua con un pH de al menos 13 para obtener una solución A,

b) Añadir del 30 al 90 % en peso de polietilenglicol que tiene un peso molecular entre 200 y 800 dalton, para obtener una solución A',

20 c) Neutralizar la solución A' con una solución acuosa de un ácido inorgánico para obtener la composición que comprende natamicina que tiene un pH que varía de 6 a 9, preferiblemente, entre 7 y 8,

25 en donde la base orgánica se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de colina, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio.

En una realización preferida, la invención se refiere a un proceso para preparar composición que comprende natamicina que comprende las etapas de

30 a) Disolver del 0,1 al 20 % en peso de natamicina con el 5 al 35 % en peso de una base orgánica disuelta en agua con un pH de al menos 13 para obtener una solución A,

b) Neutralizar la solución A con un ácido orgánico para obtener la composición que comprende natamicina que tiene un pH que varía de 6 a 9, preferiblemente, entre 6,5 y 8,5, o entre 7 y 8,

35 en donde la base orgánica se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de colina, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, y en donde el ácido orgánico se selecciona de ácido propiónico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido láctico, ácido hexanoico o ácido tartárico.

40 Preferiblemente, la base orgánica es hidróxido de colina. Preferiblemente, el ácido orgánico es ácido propiónico. Opcionalmente, del 0,5 al 90 % en peso de PEG puede añadirse a la solución A o A' o después de la etapa de neutralización. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular entre 200 y 800. La composición contiene preferiblemente entre el 5 y el 45 % en peso de agua.

45 Durante la etapa a) del proceso según la invención, generalmente se obtiene una solución de color naranja/marrón. Durante la etapa de neutralización, el color se vuelve más claro cuando el pH disminuye. El cambio de color es una indicación para lograr una composición que tiene un pH cercano a neutro. El valor de pH real de la composición acuosa puede determinarse con medios conocidos, como, por ejemplo, papel indicador de pH.

50 En una realización preferida, la invención se refiere a un proceso para preparar una composición que comprende natamicina que comprende las etapas de

a) Disolver del 0,1 al 20 % en peso de natamicina con el 5 al 35 % en peso de hidróxido de colina disuelto en agua con un pH de al menos 13 para obtener una solución A,

55 b) Neutralizar la solución A con ácido propiónico para obtener la composición que comprende natamicina que tiene un pH que varía de 6 a 9, preferiblemente, entre 7 y 8.

60 Opcionalmente, se puede añadir del 0,5 al 90 % en peso de PEG a la solución A o después de la etapa de neutralización. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular entre 200 y 800. La composición contiene preferiblemente entre el 5 y el 45 % en peso de agua.

En una realización preferida, la invención se refiere a un proceso para preparar una composición que comprende natamicina que comprende las etapas de

65

a) Disolver del 4 al 10 % en peso de natamicina con el 5 al 30 % en peso de hidróxido de colina disuelto en agua con un pH de al menos 13 para obtener una solución A,

b) Añadir una solución acuosa de hidróxido de colina que se neutraliza con ácido propiónico para obtener la solución A',

c) Neutralizar la solución A' con ácido propiónico para obtener composición que comprende natamicina que tiene un pH que varía de 6 a 9, preferiblemente, entre 7 y 8,

en donde la solución neutralizada de hidróxido de colina se prepara a partir de una solución de hidróxido de colina que tiene entre el 15 y el 50 % en peso de hidróxido de colina en agua, preferiblemente, del 25 al 45 % en peso de hidróxido de colina en agua.

En una realización preferida, la invención se refiere a un proceso para preparar una composición que comprende natamicina que comprende las etapas de

a) Disolver del 4 al 10 % en peso de natamicina con el 5 al 35 % en peso de hidróxido de colina disuelto en agua con un pH de al menos 13 para obtener una solución A,

b) Neutralizar la solución A con ácido propiónico para obtener composición que comprende natamicina que tiene un pH que varía de 6 a 9, preferiblemente, entre 7 y 8.

Opcionalmente, se puede añadir del 0,5 al 30 % en peso de PEG a la solución A o después de la etapa de neutralización. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular entre 1000 y 10000 y se disuelve en una cantidad igual de agua antes de añadirse al proceso. La composición contiene preferiblemente entre el 5 y el 45 % en peso de agua.

En una realización, la invención se refiere a un proceso para preparar una composición que comprende natamicina que comprende las etapas de

a) Disolver del 0,1 al 20 % en peso de natamicina con el 0,5 al 2,5 % en peso de hidróxido de potasio disuelto en agua con un pH de al menos 13 para obtener una solución A,

b) añadir del 30 al 80 % en peso de polietilenglicol que tiene un peso molecular entre 200 y 800 dalton, para obtener una solución B,

c) Neutralizar la solución B con ácido propiónico para obtener la composición que comprende natamicina que tiene un pH que varía de 6 a 9, preferiblemente, entre 7 y 8.

La composición contiene preferiblemente entre el 5 y el 45 % en peso de agua.

Cuando se usa una base inorgánica para disolver natamicina, es posible añadir bases orgánicas menos fuertes para producir una composición estable. Un ejemplo de dichas bases son aminas e iminas, como, por ejemplo, bPEI, que es una polietilenimina ramificada. Sin embargo, tales procesos y composiciones, cuando se usa una base inorgánica, no forman parte de la invención reivindicada.

La invención también se refiere a una composición que comprende el producto de reacción del 0,1 al 20 % en peso de natamicina, del 5 al 30 % en peso de hidróxido de colina y un ácido orgánico, en donde el ácido orgánico se selecciona de ácido propiónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico y ácido láctico. La composición puede contener además del 5 al 90 % en peso de agua, entre el 0 y el 85 % en peso de PEG y aditivos. Preferiblemente, la composición comprende el producto de reacción entre el 4 y el 10 % en peso de natamicina, entre el 5 y el 10 % en peso de hidróxido de colina, del 50 al 85 % en peso de PEG que tiene un peso molecular entre 200 y 800 dalton, y el ácido orgánico, en donde la composición comprende entre el 5 y el 45 % en peso de agua, preferiblemente, del 5 al 20 % en peso de agua.

La composición comprende preferiblemente del 1 al 18 % en peso de natamicina, o del 3 al 12 % en peso o del 4 al 10 % en peso, con respecto a la composición total.

La relación de peso entre natamicina y agua es preferiblemente entre 1:0,5 y 1:12. La relación de peso entre natamicina e hidróxido de colina es preferiblemente entre 1:0,4 y 1:100. Preferiblemente, la composición comprende entre el 5 y el 45 % en peso de agua.

La composición de la invención puede contener aditivos, en particular, aditivos para mejorar el aspecto y la sensación del producto una vez que contiene la composición. En el caso de una semilla, por ejemplo, puede comprender agentes antiadherentes, agentes que mejoran la fluidez de la semilla y/o agentes que mejoran la apariencia óptica de la semilla, tales como pigmentos y agentes de brillo.

Por consiguiente, la invención se refiere además a un método para tratar un producto agrícola o un producto alimenticio, que comprende aplicar una composición de la invención en un producto agrícola o un producto alimenticio, respectivamente.

- 5 La invención se refiere además a un producto agrícola o producto alimenticio obtenible con dicho método.

La invención se refiere además a un producto agrícola o producto alimenticio que comprende una composición de la invención.

- 10 Una composición de la invención también puede encontrar aplicación en el campo médico. Por lo tanto, la invención se refiere además a una composición de la invención para uso médico. La invención se refiere en particular a una composición de la invención para el tratamiento de una infección fúngica. La composición puede usarse, por ejemplo, como crema o potaje para tratar infecciones tópicas, por ejemplo, de la piel o moco, tal como en el área genital. La acción de la composición también puede ser enteral o parenteral. Preferiblemente, el compuesto auxiliar en la composición comprende un polímero farmacéuticamente aceptable, p. ej., PEG.

Materiales y métodos

Se utilizan los siguientes procedimientos experimentales

- 20 1) Preparación de las composiciones de natamicina

Las composiciones que comprenden natamicina se prepararon como formulaciones de 100 g. Ejemplos son la preparación de una formulación que comprende el 5 % en peso de natamicina (50.000 ppm). La natamicina es suministrada por Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd. La natamicina usada es de >90 % de pureza, por lo que se usan 5,5 gramos de esta natamicina para la preparación de formulaciones de 100 g. Todos los demás materiales, excepto el tiram, son suministrados por Acros Organics. El agua usada es agua corriente.

30 Durante la preparación, la natamicina se disuelve a un pH 13-14 añadiendo una solución alcalina de una base anorgánica, tal como KOH (7 % en peso - 25 % en peso) de o una base orgánica tal como hidróxido de colina (25 % en peso - 45 % en peso). Se puede añadir PEG-200 calentado, suministrado por Acros Organics, o una cantidad adicional de base orgánica. Después de eso, se realiza neutralización a pH 6,5-8 u otro pH con un ácido orgánico, tal como ácido propiónico. Los ácidos orgánicos son líquidos (p. ej., ácido propiónico 98 % y solución acuosa de ácido láctico 85 %) o en forma de polvo/cristalina (ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico). Los ácidos orgánicos sólidos requieren un tiempo de mezcla y neutralización más largo que los ácidos orgánicos líquidos.

40 Se utiliza un recipiente de vidrio de 150 mL para las etapas de preparación. Se usa un agitador magnético para mezclar materiales siempre que la viscosidad sea lo suficientemente baja. Se usa una cuchara para mezclar mezclas de viscosidad más alta, especialmente cuando se mezcla polvo de natamicina con la primera cantidad de solución alcalina. Añadir demasiada solución alcalina en 1 etapa puede crear grumos de natamicina, que son difíciles de disolver. Se utiliza un recipiente de vidrio para calentar PEG-200 en un magnetrón, con lo cual se mide la temperatura con un termómetro de infrarrojos. El pH se mide utilizando papel indicador de pH. Antes de la neutralización, con frecuencia, el pH está por encima de pH 13. Durante la neutralización, el color de la mezcla se vuelve más claro por debajo de pH 10, el color es especialmente más claro en el intervalo de pH objetivo. Además, la viscosidad de la mezcla se reduce al mismo tiempo que el color se aclara. La solución final es principalmente transparente y de color rojo-marrón.

50 Tras una dilución de 12x con 11 partes de agua mezcladas con 1 parte de solución de natamicina, la dilución puede presentar cristalización después de un período de varias horas a 24 horas. La relación de dilución de 12x se elige debido a que esta tasa de dilución parece presentar relativamente más cristalización que otras relaciones de dilución. También es una relación que puede usarse para producir soluciones a partir de soluciones madre en condiciones prácticas.

Ejemplo 1

55 Se han preparado diferentes composiciones según la presente invención con PEG 200 y PEG 6000 como polímeros, hidróxido de colina como base y ácido propiónico como compuesto neutralizante. Se han preparado composiciones con el 5 al 20 % en peso de natamicina, mostrándose todas ellas estables.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

60 En cada experimento se ha realizado una corrección de la pureza de la natamicina. Por ejemplo, si se prepara una composición que tiene el 5 % en peso de natamicina, y la pureza de la natamicina es del 90 %, la cantidad de natamicina (90 %) es $5/0,9 = 5,55 \text{ g}/100 \text{ g}$ de composición. En este ejemplo, se usa una natamicina con una pureza >90 %, suministrada por Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd. La cantidad de natamicina se pesa en un recipiente de vidrio de 150 ml. Se añade la cantidad adecuada de solución acuosa de hidróxido de colina al 45 % en peso, suministrada por Acros Organics, en 1 o 2 etapas, a la natamicina. En la primera etapa, se añade no más de 1,5x la cantidad de natamicina para realizar una mezcla suave. Si se usa agua, la misma se añade después de que se haya mezclado la cantidad de

hidróxido de colina con la natamicina. El agua facilita la obtención de una solución de color marrón claro. Cuando no se usa agua, el resultado de la etapa de disolución puede ser una mezcla con una constitución de pasta. El PEG-200 se calienta en un recipiente de vidrio en un magnetrón, hasta la primera temperatura descrita. La temperatura se mide después de la mezcla mediante un termómetro de infrarrojos. El PEG-200 calentado se añade a la mezcla de natamicina, solución de hidróxido de colina y, opcionalmente, agua. Se usa una cuchara y luego un agitador magnético para procesar esta mezcla en una solución uniforme. La temperatura es medida de nuevo y se indica como el segundo valor de temperatura. El color de la solución es marrón rojizo oscuro con un pH superior a 13. La mezcla caliente se neutraliza a pH 6,5-8 añadiendo con una jeringa la cantidad indicada de ácido propiónico líquido con un 98 % de pureza. Durante la neutralización, el color de la solución se vuelve más claro por debajo de pH 10. El pH se mide de nuevo utilizando papel indicador de pH. El agente neutralizante de ácido propiónico se añade después de la adición del PEG.

Con concentraciones más altas de natamicina, el PEG necesita tener mayor temperatura para un aumento de temperatura suficiente de la mezcla para obtener soluciones transparentes que incluyen PEG. Se pueden usar PEG de mayor peso molecular, tales como PEG-6000 o PEG-1500, después de disolver en una cantidad aproximadamente igual de agua y calentar. La viscosidad de la solución final después del almacenamiento durante varios días usando PEG de mayor peso molecular será relativamente mayor.

La solución final es de color marrón rojizo, de una viscosidad baja a una viscosidad más alta dependiendo de la concentración de natamicina y formando soluciones estables.

Tras una dilución de 12x con 11 partes de agua mezcladas con 1 parte de solución de natamicina, la dilución puede presentar cristalización después de un período de varias horas a 24 horas.

	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
Natamicina 90 % pureza (% en peso)	5,6	7,4	8,3	5,6	8,3	11,1	16,7	22,2	5,6
Polímero	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG6000
Conc. final polímero (% en peso)	78,0	78,4	78,0	30,0	75,7	72,1	63,8	48,6	20,0
Temperatura antes mezcla	57°C → 44°C	63°C → 37°C	83°C → 47°C	20°C → 39°C	63°C → 42°C	83°C → 45°C	83°C → 45°C	83°C → 42°C	67°C → 40°C
Base	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina
cantidad base (% en peso)	3,35	4,3	4,95	22,5	4,9	6,3	7,4	10,8	19,2
agua (% en peso)	11,6	7,7	6,05	27,5	9	7,7	9,1	13,2	43,4
Agente neutralizante	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	1,4	2,2	2,65	14,4	2,1	2,8	3	5,2	11,8
Relación (p/p) Natam/ polímero	1/15,6	1/15,8	1/15,6	1/6	1/10,1	1/7,2	1/4,2	1/2,45	1/4
Transparente o turbia	transparente	ligeramente lechosa	ligeramente lechosa	transparente	transparente	transparente	transparente	turbia	transparente
Color	marrón rojizo	marrón rojizo	marrón rojizo	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón claro
Viscosidad (indicación)	baja	baja	baja	baja	intermedia	intermedia	alta	muy alta	baja
Estabilidad (visual)					...				
Cristales u otras estructuras en dilución 12x con agua después de 24 horas (visual)									

Tabla 1 Ejemplos según la invención.

Estabilidad (visual)		Cristales u otras estructuras en dilución 12x con agua después de 24 horas (visual)	
.....	Transparente		Transparente
....	Ligeramente lechosa		Ligera nube de cristales
...	Lechosa, después algún sedimento	...	Nube de cristales
..	Sedimento	..	Capa de cristales
.	Gran cantidad de sedimento	.	Capa espesa de cristales

Todas las composiciones tienen una alta cantidad de natamicina, son estables y no cristalizan.

Ejemplo 2

5 El Ejemplo 2 muestra composiciones comparables a las composiciones del ejemplo 1, pero preparadas en un orden diferente: la neutralización con ácido propiónico se realiza antes de la adición de PEG.

Los resultados se resumen en la tabla 2.

10

	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
Natamicina 90 % pureza (% en peso)	5,60	5,60	5,60	5,60	11,10	5,60
Polímero	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG300
Conc. final polímero (% en peso)	48,7	48,7	69,4	29,4	44,2	47,9
Temperatura antes mezcla	87°C -> 48°C	20°C -> 32°C	57°C -> 47°C	60°C -> 40°C	97°C -> 52°C	60°C -> 42°C
Base	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina
Cantidad base (% en peso)	16,2	16,2	9	22,5	16,2	16,3
Agua (% en peso)	20	20	11	27,5	20	20,1
Agente neutralizante	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	9,5	9,5	5	15	8,5	10,1
Relación (p/p) Natam/polímero	1/9,8	1/9,8	1/13,8	1/6	1/9	1/9,6
transparente o turbia	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
Color	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro	marrón rojizo oscuro
Viscosidad (indicación)	baja	baja	baja	baja	baja	baja
Estabilidad (visual)			...			
Cristales u otras estructuras en dilución 12x con agua después de 24 horas (visual)			..			

Tabla 2

Ejemplo 3.

Los experimentos se realizan con diferentes ácidos orgánicos, para neutralizar las soluciones de natamicina.

5 Los resultados se muestran en la tabla 3.

La cantidad de natamicina usada se calcula a partir de su pureza. En este ejemplo, se usa una natamicina con una pureza >90 %, suministrada por Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd. La cantidad de natamicina para la mayoría de los objetos es 5,5 gramos, pesada en un recipiente de vidrio de 150 ml. Se añade la cantidad adecuada de solución acuosa de hidróxido de colina al 45 % en 1 o 2 etapas a la natamicina.

En la primera etapa, se añade no más de 1,5x la cantidad de natamicina para realizar una mezcla suave. Después de esta adición, las mezclas de natamicina - hidróxido de colina se diluyen más con hidróxido de colina adicional (45 % en peso en agua).

15 En una etapa final, todas las composiciones se neutralizan con ácidos orgánicos, con agitación, con un agitador magnético. El pH final se confirma utilizando un papel indicador de pH. La temperatura de reacción durante la neutralización varió entre 35°C y 47°C.

20 Las soluciones se observan visualmente en cuanto a color, claridad/turbidez y viscosidad. Las soluciones se diluyen 12x con agua mezclando 11 partes de agua con 1 parte de solución. La formación de cristales en esta dilución se verifica visualmente después de 6 horas y 24 horas.

	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7
Natamicina 90 % pureza (% en peso)	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Polímero	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
Conc. final polímero (% en peso)	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura antes mezcla	20°C → 42°C	20°C → 39°C	20°C → 39°C	20°C → 45°C	20°C → 39°C	20°C → 39°C	20°C → 37°C
Base	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina	OH colina
Cantidad base (% en peso)	33,5	32,4	34,5	33,6	30,6	29,1	33,3
Agua (% en peso)	40,7	39,5	41,9	40,8	37	35,3	40,1
Agente neutralizante	ácido propiónico	ácido cítrico	ácido fumárico	ácido málico	ácido láctico 85 %	ácido hexanoico	ácido tartárico
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	20,2	22,5	18	20	26,8	30	21
Relación (p/p) Natam/polímero	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
transparente o turbia	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
Color	color marrón claro	color marrón claro	color marrón claro	color marrón claro	color marrón claro	color marrón claro	color marrón claro
Viscosidad	baja	baja	baja	baja	baja	baja	baja
Estabilidad	estable	estable; pH 6,4; marrón oscuro después almacenamiento	estable	estable	estable	estable	estable; después de 10 días aún no muy oscuro
Formación cristales u otras estructuras en dilución 12x con agua	después de 24 horas: *****	después de 6 horas: **	después de 24 horas: ****	después de 6 horas: ****	después de 24 horas: ****	después de 2 horas: *	después de 24 horas: *****
Bio-actividad	*****	****	*****	****	*****	*****	*****

Antifúngica							
Crecimiento planta						.	

Tabla 3

Bio-actividad Antifúngica		Crecimiento planta	
.....	Sin crecimiento de hongos		Crecimiento saludable
....	Crecimiento pequeño lento de hongos		Algún crecimiento anormal
...	Crecimiento de hongos	...	Crecimiento anormal
..	Crecimiento de hongos que cubre algunas semillas	..	Mucho crecimiento anormal
.	Crecimiento intenso de hongos que cubre todas las semillas	.	Casi sin crecimiento

- 5 Las composiciones del ejemplo 3 se han probado como diluciones en lo que respecta a su bioactividad (antifúngica) y apoyo al crecimiento de las plantas.

La bioactividad de las composiciones en hongos se determina en diversas diluciones sobre el crecimiento y la supervivencia de las esporas de *Aspergillus niger*. El crecimiento del cultivo de *Aspergillus niger* se mide por OD (densidad óptica) por OD600.

Método

15 Las esporas de *Aspergillus niger* y el medio se añaden a una placa de 96 pocillos y se incuban para germinar las esporas. Después de la germinación de las esporas, la formulación se añade en triplete en varias diluciones junto con un medio adicional y una cantidad de luciferina. La placa de pocillos se incuba en un lector de placas que mide cada 5 minutos tanto la OD como la luminiscencia emitida.

20 Se han inspeccionado visualmente los resultados de la actividad antifúngica y del crecimiento de las plantas de los diferentes ejemplos. Una alta actividad antifúngica se califica como 5 puntos, mientras que una actividad antifúngica deficiente se indica con un único punto.

Una excelente estimulación del crecimiento de las plantas se indica con 5 puntos, mientras que el crecimiento de las plantas deficiente se indica con un único punto.

Ejemplo 4

Las composiciones se han preparado con diferentes bases orgánicas. Los resultados se muestran en la tabla 4.

30 La cantidad de natamicina usada se calcula a partir de su pureza. En este ejemplo, se usa una natamicina con una pureza >90 %, suministrada por Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd. Para la mayoría de los objetos, la cantidad de 5,5 gramos de natamicina con un 90 % de pureza se pesa en un recipiente de vidrio de 150 ml. Se añaden las cantidades adecuadas de solución acuosa de hidróxido de colina al 45 % en 1 o 2 etapas a la natamicina.

35 En la primera etapa, se añade no más de 1,5x la cantidad de natamicina para realizar una mezcla suave.

Acros Organics suministró soluciones acuosas al 25 % en peso de hidróxido de tetraetilamonio e hidróxido de tetrametilamonio. Estas se añaden en 2-3 etapas a la natamicina y se mezclan con una cuchara.

40 El PEG-200 se calienta en un recipiente de vidrio en un magnetrón, hasta la primera temperatura descrita. La temperatura se mide después de la mezcla mediante un termómetro de infrarrojos. El PEG-200 calentado se añade a la mezcla de natamicina, solución de hidróxido de tetraetilamonio. Se usa una cuchara y luego un agitador magnético para procesar esta mezcla en una solución uniforme.

45 Todos los objetos se neutralizan finalmente con ácidos orgánicos, con agitación, con un agitador magnético. El pH final se confirma utilizando un papel indicador de pH. La temperatura final de todos los objetos está en un intervalo de 30°C - 50°C.

50 Las soluciones se observan visualmente en cuanto a color, claridad y viscosidad. Las soluciones se diluyen 12x con agua mezclando 11 partes de agua con 1 parte de solución. La formación de cristales en esta dilución se verifica visualmente después de 24 horas.

	1.1	1.2	4.1	4.2	4.3	5.0
Natamicina 90 % pureza (% en peso)	5,60	7,40	5,60	7,40	7,40	5,60
Polímero	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200
Conc. final polímero (% en peso)	78	78	78	65	65	61
Temperatura antes mezcla	57°C → 44°C	63°C → 37°C	57°C	57°C	57°C	70°C → 50°C
Base	OH colina	OH colina	TEAOH	TEAOH	TMAOH	KOH + bPEI
Cantidad base (% en peso)	3,4	4,3	3,8	6,3	6,3	1,6+8
Agua (% en peso)	11,6	8,1	11,3	18,6	18,8	14,8
Agente neutralizante	propiónico	propiónico	propiónico	láctico 85 %	propiónico	propiónico
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	1,4	2,2	1,25	2,75	2,0	9,0
Relación (p/p) Natam/polímero	1/15,6	1/15,6	1/15,6	1/13	1/13	1/12,2
transparente o turbia	transparente	ligeramente lechosa	transparente	transparente	transparente	transparente
Color	marrón rojizo	marrón rojizo	color marrón claro	color rojo oscuro-marrón	color rojo oscuro-marrón	color rojo oscuro-marrón
Viscosidad (visual)	baja	baja	baja	baja	baja	baja
Estabilidad (visual)						
Formación de cristales en dilución 12x con agua después de 24 horas (visual)			..			

Tabla 4 ejemplos con diferentes bases orgánicas que incluyen hidróxido de tetraetilamonio e hidróxido de tetrametilamonio.

5 Ejemplo 5

La Tabla 5.1 muestra ejemplos de composiciones preparadas con una base inorgánica (KOH) en lugar de la base orgánica preferida. También se han añadido dos experimentos comparados: el experimento comparativo A describe un experimento, en donde no se añade una base, sino que solo se añadió PEG a la natamicina: no se pudo obtener ninguna composición soluble. El experimento comparativo B muestra el efecto de disolver natamicina con KOH, y posteriormente neutralizar con HCl, pero en ausencia de PEG. No se pudo obtener una composición adecuada con una alta concentración de natamicina disuelta.

La cantidad de natamicina usada se calcula a partir de su pureza. En este ejemplo, se usa una natamicina con una pureza >90 %, suministrada por Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd. Para estos experimentos, la cantidad de 5,5 gramos de natamicina con un 90 % de pureza se pesa en un recipiente de vidrio de 150 ml. Se añaden las cantidades adecuadas de agua o solución acuosa de hidróxido de potasio en 1 o 2 etapas a la natamicina. En la primera etapa, se añade no más de 1,5x la cantidad de natamicina para realizar una mezcla suave.

El PEG-200 se calienta en un recipiente de vidrio en un magnetrón, hasta la primera temperatura descrita. La temperatura se mide después de la mezcla mediante un termómetro de infrarrojos. El PEG-200 calentado se añade a la mezcla de natamicina, solución de hidróxido de potasio o agua. Se usa una cuchara y luego un agitador magnético para procesar esta mezcla en una solución o suspensión uniformes en el caso del experimento comparativo A.

Todos los experimentos con solución alcalina finalmente se neutralizan con solución de HCL al 10 % o ácido propiónico a pH 6,5-8 bajo agitación con un agitador magnético. El pH final se confirma utilizando un papel indicador de pH. La temperatura final de todos los experimentos puede ser alta cuando se ponen una segunda vez en el magnetrón.

La bioactividad de las composiciones en hongos se determina en diversas diluciones sobre el crecimiento y la supervivencia de las esporas de *Aspergillus niger*. El crecimiento del cultivo de *Aspergillus niger* se mide por OD (densidad óptica) por OD600.

La bioactividad de las composiciones en oomicetos se determina con una relación de dilución de 10x utilizada con un cultivo de *Phytophthora infestans* en placas, mediante la evaluación del crecimiento y la supervivencia de los *P. infestans* por inspección visual por parte de un microbiólogo experto.

En ausencia de uso de una solución alcalina, la composición es una suspensión que es inestable y forma un depósito de cristales en el fondo. La bioactividad contra hongos es promedio y la bioactividad contra oomicetos es baja. El ejemplo 5.3 muestra una buena bioactividad contra hongos y una bioactividad bastante buena contra oomicetos. Una alta temperatura combinada con una alta concentración de solución alcalina, por ejemplo 5.3 y 5.4, reduce la bioactividad contra hongos a un nivel muy bajo.

La Tabla 5.2 muestra ejemplos de composiciones preparadas con KOH y además bPEI (polietileno-imina ramificado) con un peso molecular de 600 suministrado por Polysciences Europe GmbH.

El bPEI se introduce en el proceso después de disolver la natamicina con solución KOH. Una solución acuosa de bPEI al 50 % se mezcla con la mezcla de KOH-natamicina. Con ello, el proceso continúa añadiendo PEG calentado y, finalmente, con la etapa de neutralización.

	A	B	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5
Natamicina 90 % pureza	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Polímero	PEG200	Ninguno	PEG6000	PEG200	PEG200	PEG200	PEG6000
Conc. final polímero (% en peso)	80	0	35	81	79	89	34
Temperatura antes mezcla	84°C → 55°C		86°C → 48°C	80°C → 51°C	79°C → 53°C	110°C → 100°C	50°C → 35°C
Tipo de base	ninguna	KOH	KOH	KOH	KOH	KOH	KOH
Base (% en peso)	0	1,05	1,05	1,25	3,1	1,3	1,05
Agua (% en peso)	14,4	88,4	53	11,2	9,4	3,7	54
Agente neutralizante	ninguno	sol. HCL 10 %	sol. HCL 10 %	ácido propiónico	ácido propiónico	ácido propiónico	sol. HCL 10 %
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	0	5	5	1	2,5	1	5
Relación (p/p) Natam/polímero	1/16	1/0	1/7	1/16,2	1/16	1/17,8	1/7
transparente o turbia	turbia	turbia	turbia	oscura	negra	negra	turbia
Color	blanco	blanco	marrón-amarillo	rojo oscuro marrón	marrón rojizo muy oscuro	marrón rojizo muy oscuro	marrón amarillo
Viscosidad	Viscosidad baja	Viscosidad muy alta	Viscosidad media	Viscosidad baja	Viscosidad media	Viscosidad media	alta
Estabilidad	No estable. Deposición en capa de cristales.	Pasta.	No estable. Sedimento y mayor viscosidad.	Un poco de sedimento después de almacenamiento	Aumenta viscosidad. Estable.	Estable	
Bioactividad en hongos	...				..	..	..
Bioactividad en oomicetos	.		.				

Tabla 5.1 Uso de KOH como base.

	5.6	5.7	5.8	5.9	5.10
Natamicina 90 % pureza (% en peso)	5,60	5,60	5,60	5,60	5,60
Polímero	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200	PEG200
Conc. final polímero (% en peso)	61	67	70	74	75
Temperatura antes	70°C → 50°C	72°C → 50°C	72°C → 50°C	72°C → 50°C	75°C → 55°C

mezcla					
Base	KOH + bPEI	KOH + bPEI	KOH + bPEI	KOH + bPEI	KOH + bPEI
Cantidad base (% en peso)	1,6+8	1,6+6	1,6+4	1,6+2	1,6+1
Agua (% en peso)	15	15	15	15	15
Agente neutralizante	propiónico	propiónico	propiónico	propiónico	propiónico
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	9,0	5,0	3,5	2,5	2,1
Relación (p/p) Natam/polímero	1/12,2	1/13,4	1/14	1/14,8	1/15
transparente o turbia	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
Color	color rojo oscuro-marrón	color rojo oscuro-marrón	color rojo oscuro-marrón	color rojo oscuro-marrón	color rojo oscuro-marrón
Viscosidad (visual)	baja	baja	baja	baja	baja
Estabilidad (visual)					
Formación de cristales en dilución 12x con agua después de 24 horas (visual)					

Tabla 5.2 Uso de KOH y bPEI como bases.

Bioactividad en esporas de hongos		Bioactividad en esporas de oomicetos	
.....	Control completo con dilución >1500x		Control completo con dilución 150x
....	Control completo con dilución 1500x		Control completo con dilución 150x para limitado
...	Control completo con dilución <1500x	...	Reducción de crecimiento de oomicetos
..	Reducción de crecimiento de hongos	..	Reducción limitada de crecimiento de oomicetos
.	Sin reducción de crecimiento	.	Sin reducción de crecimiento

5 Ejemplo 6

En el ejemplo 6 se han disuelto tres moléculas bioactivas diferentes con el método según la presente invención.

Xi'an Lyphar Biotech Co.,LTD suministra ácido betulínico al 98 %;

10

XI'AN HEALTH BIOCHEMICAL TECHNOLOGY CO.,LTD suministra anfotericina B al 86 %;

BIOSYNTH AG suministra ácido gibberélico GA3 al 90 %.

15

Las composiciones se han preparado tomando el componente bioactivo, añadiendo la base con agua para disolver el compuesto bioactivo, seguido de la adición de PEG caliente. Después de agitar para producir una solución transparente, se ha añadido el agente neutralizante para preparar la solución de la sustancia bioactiva.

Los resultados se resumen en la tabla 6.

20

	6.1	6.2	6.3
Bioactivo	Ácido betulínico	Anfotericina B	Ácido gibberélico GA3
Conc. final bioactivo (% en peso)	2,0	2,5	10,0
Polímero	PEG200	PEG200	PEG200
Conc. final polímero (%)	92	84	56

en peso)			
Temperatura antes mezcla	100°C → 75°C	100°C → 75°C	60°C → 40°C
base	OH colina	KOH	KOH
Cantidad base (% en peso)	1,1	0,7	2
Agua (% en peso)	4,1	9,8	23
Agente neutralizante	ácido propiónico	sol. ácido sulfúrico 10 %	sol. HCl 10 %
Cantidad agente neutralizante (% en peso)	0,5	3,5	9
Relación (p/p) Bioactivo/polímero	1/46	1/33,4	1/5,6
transparente o turbia	transparente	transparente	transparente
Color	amarillento	muy oscuro, rojizo	amarillo muy leve
Viscosidad	Viscosidad baja	Viscosidad baja	Viscosidad baja
Estabilidad	Estable.	Estable	Estable

Tabla 6.

Ejemplo 7

Tratamiento de semillas con una composición de natamicina

Las semillas se trataron con la composición de natamicina típicamente preparada como una mezcla de 400 ppm, es decir, una mezcla que comprendía 0,4 g de natamicina por kg de semilla. Por ejemplo, cuando se usó una composición que comprendía el 5 % en peso de natamicina (50.000 ppm), se diluyeron en primer lugar 0,16 g de la composición hasta un peso de 2,0 g (4000 ppm). A continuación, esta mezcla diluida se aplicó en 20 g de semillas. El agua se evaporó durante 8 horas en el aire a temperatura ambiente, produciendo una porción de semillas que comprendía 400 ppm de natamicina. Se llevaron a cabo experimentos comparativos con tiram, usando una formulación 42-S suministrada por Bayer Cropscience de Estados Unidos, que contenía un 42 % de tiram. Esta solución se diluyó añadiendo agua a 0,16 g de la solución de tiram hasta alcanzar el peso de 2 g. A continuación, esta mezcla diluida se aplicó en 20 g de semillas. Se obtuvo un recubrimiento alrededor de las semillas permitiendo que el disolvente se evaporara durante 8 horas en el aire a temperatura ambiente, produciendo una porción de semillas que comprendía 3,36 g de tiram por kg de semillas (3360 ppm). Se preparó una segunda formulación en las semillas que comprendía 0,840 g de tiram por kg de semillas (840 ppm).

A continuación, las semillas se colocaron en papel de germinación (papel suministrado por Allpaper BV, tipo T10 D 140*200, 550 g/m²) y el crecimiento de hongos se controló a medida que las semillas germinaron, típicamente durante 7-30 días a temperatura ambiente. En experimentos comparativos, se usaron semillas infectadas no tratadas o semillas infectadas tratadas con tiram. Los resultados de este ensayo son como efectividades de la inhibición del crecimiento de las composiciones de hongos, representadas en una escala de 1-5 (1 = sin efecto; 2 = efecto pequeño; 3 = efecto estándar; 4 = efecto bueno; 5 = efecto excelente). El efecto de la composición sobre el crecimiento de la planta se representa en una escala de 1-5 (1 = efecto negativo fuerte; 2 = efecto negativo bastante fuerte; 3 = efecto negativo pequeño; 4 = sin efecto; 5 = efecto positivo).

La eficacia de las composiciones de la invención se comparó con las de las composiciones antifúngicas que comprendían tiram. Los resultados obtenidos con el “ensayo de semillas de plantas #1” se visualizan en las Figuras 1 y 2, conteniendo cada una una fotografía que comprende dos áreas de prueba (izquierda y derecha) de semillas de trigo Tartaros (cosecha de 2014) naturalmente infectadas con hongos (predominantemente Fusarium). Todas las áreas registran la situación después de siete días de la siembra. El área izquierda de la Figura 1 contiene semillas no tratadas, mientras que el área derecha contiene la composición de natamicina de la entrada 5.5 de la Tabla 5, que está presente en una concentración de 400 ppm en la semilla y tiene una eficacia antifúngica de 4. Las dos áreas de la Figura 2 contienen una formulación de tiram de diferente concentración. En el área izquierda, la concentración es de 3360 ppm, en el área derecha es de 840 ppm. En ambas áreas, se inhibe el crecimiento del hongo, cuyo grado se corresponde con una eficacia de 3 en la escala indicada de 1-5 (eficacia estándar). Sin embargo, este es un grado más pequeño que la inhibición mediante la composición de natamicina de la Figura 1 (eficacia de 4). Además, se puede ver claramente que el tiram tiene un efecto fitotóxico en comparación con la natamicina, ya que la germinación de las semillas en la Figura 2 se desarrolla sustancialmente menos. El efecto es el mayor con la concentración más alta de tiram (área izquierda de la Figura 2). Por lo tanto, se puede concluir que las composiciones de natamicina de la invención son más eficaces y menos fitotóxicas que las composiciones conocidas, tales como composiciones de tiram.

También pudo observarse que las composiciones de natamicina son altamente estables cuando se almacenan en la oscuridad a temperatura ambiente, ya que no se ha observado ninguna disminución de la eficacia para composiciones de más de un año de antigüedad.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar una composición que comprende una molécula bioactiva que comprende las etapas de
 - a. Disolver una molécula bioactiva que tiene al menos un grupo ácido con una base con pH $\Rightarrow$ 11 para obtener una solución A
 - b. Neutralizar la solución A con un ácido para obtener la composición que comprende una molécula bioactiva que tiene un pH entre 6 y 9,
 en donde se añade PEG antes de la etapa de neutralización en caso de que la base y/o el ácido sean un compuesto inorgánico, en donde la molécula bioactiva es natamicina, y en donde la base es una base orgánica seleccionada del grupo que consiste en hidróxido de colina, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, e hidróxido de tetrabutilamonio.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el % en peso de la molécula bioactiva es entre el 0,1 y el 20 % en peso, más preferiblemente entre el 1 y el 18 % en peso, el 3 y el 12 % en peso o con máxima preferencia entre el 4 y el 10 % en peso.
3. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la relación de peso entre natamicina y agua es entre 1: 0,5 y 1: 12, preferiblemente la relación de peso entre natamicina y agua es entre 1:0,55 y 1:10, o entre 1:0,6 y 1:9 y en donde la cantidad de base orgánica varía del 4 al 30 % en peso, por ejemplo entre el 10 y el 25 % en peso con respecto al total de la composición.
4. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la base orgánica es hidróxido de colina, y en donde la relación de peso entre natamicina e hidróxido de colina varía entre 1: 0,4 y entre 1:100, preferiblemente entre 1:0,45 y 1:20, o entre 1:0,5 y 1:8.
5. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los ácidos orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido málico, ácido butanoico, ácido hexanoico, ácido hidroxibutanodioico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido octanoico y ácido nicotínico; preferiblemente el ácido orgánico es ácido propiónico.
6. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se añade del 20 al 80 % en peso de PEG que tiene un peso molecular entre 200 y 1000 dalton.
7. Una composición que comprende el producto de reacción del 0,1 al 20 % en peso de natamicina, del 5 al 30 % en peso de hidróxido de colina y un ácido orgánico, del 5 al 90 % en peso de agua y opcionalmente del 0 al 70 % en peso de PEG, en donde el ácido orgánico se selecciona de ácido propiónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico y ácido láctico.
8. La composición según la reivindicación 7, en donde la composición comprende del 1 al 18 % en peso de natamicina, o del 3 al 12 % en peso o del 4 al 10 % en peso, con respecto a la composición total.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en donde la relación de peso entre natamicina y agua es preferiblemente entre 1:0,5 y 1:12.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde la relación de peso entre natamicina e hidróxido de colina es preferiblemente entre 1:0,4 y 1:100.
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde la composición comprende del 20 al 80 % en peso de PEG que tiene un peso molecular entre 200 y 1000 dalton.
12. Un método para tratar un producto agrícola o un producto alimenticio, que comprende aplicar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, u obtenida en el proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en un producto agrícola o un producto alimenticio, respectivamente.
13. Un producto agrícola o producto alimenticio que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, u obtenida en el proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, u obtenida en el proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso como medicamento.
15. Composición según la reivindicación 14 para el tratamiento de una infección fúngica.

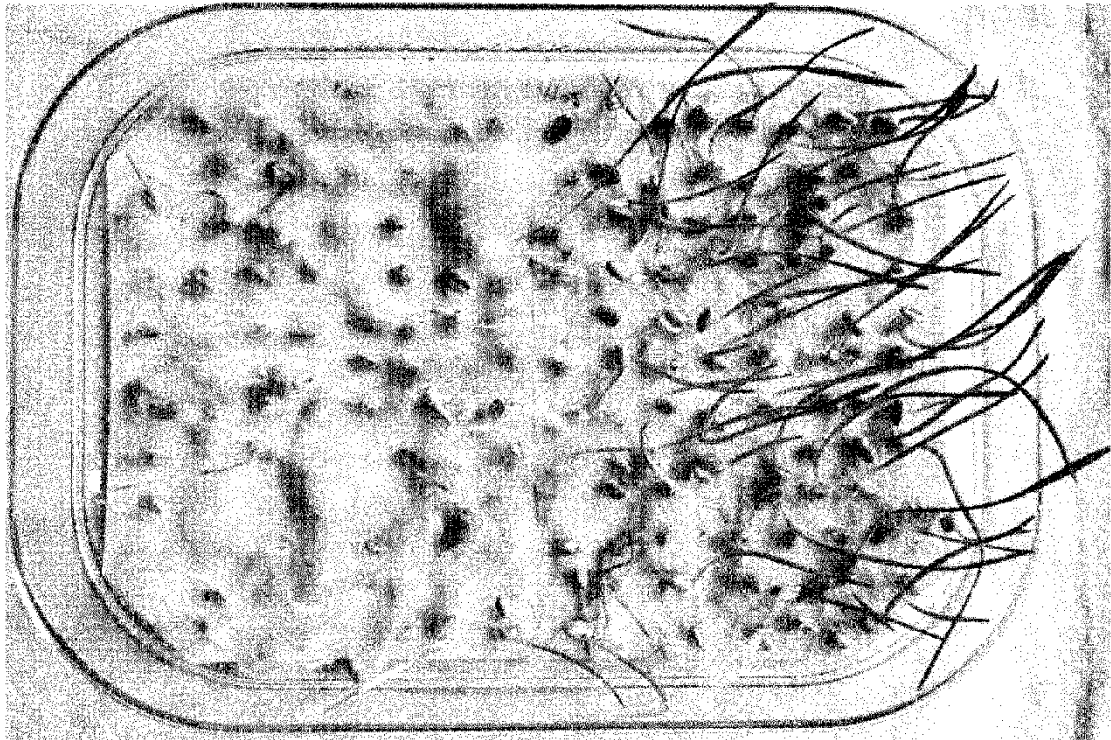


Figura 1

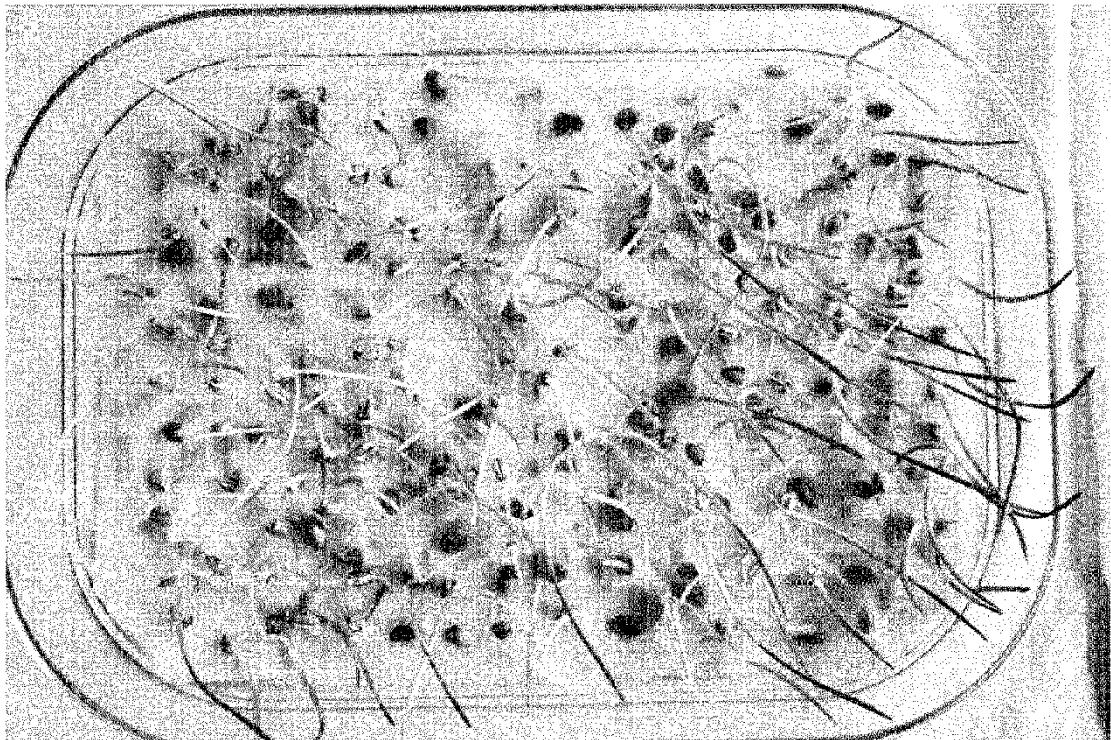


Figura 2