

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 85.535

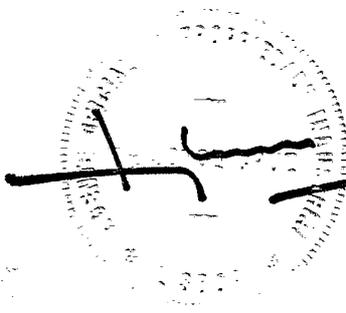
**REQUERENTE:** GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH, alemã, industrial, em Mascheroder Weg 1 - 3300 Braunschweig REPUBLICA FEDERAL ALEMÃ, e CIBA-GEIGY AG., suíça, industrial, em Klybeckstrasse 141 4002 BASEL - SUIÇA

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS A PARTIR DE MYXOCOCCUS"

**INVENTORES:** HANS REICHENBACH; KLAUS GERTH; HERBERT IRSCHIK; BRIGITTE KUNZE; GERHARD HOFLE; HERMANN AUGUSTINIAK; NORBERT BEDORF; ROLF JANSEN; WOLFRAM TROWITZSCH-KIENAST; HEINRICH STEINMETZ.

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

Suíça, em 15 de Agosto de 1986, sob o No.3294/86-6

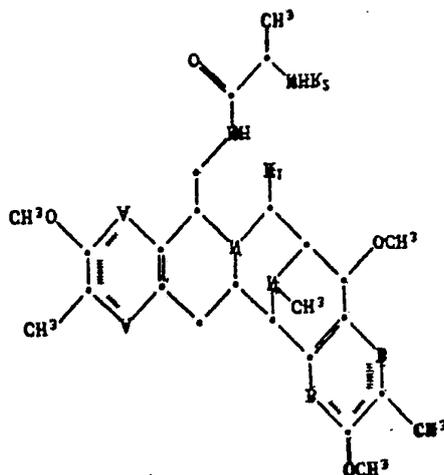


25.4.37

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O invento diz respeito a um processo para a preparação de novos alcalóides policíclicos de fórmula



=====  
GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH; e  
CIBA-GEIGY AG..  
"PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE ANTIBIOTICOS A PARTIR DE  
MYXOCOCCUS"

em que

$R^1$  representa hidrogenio ou hidroxi.

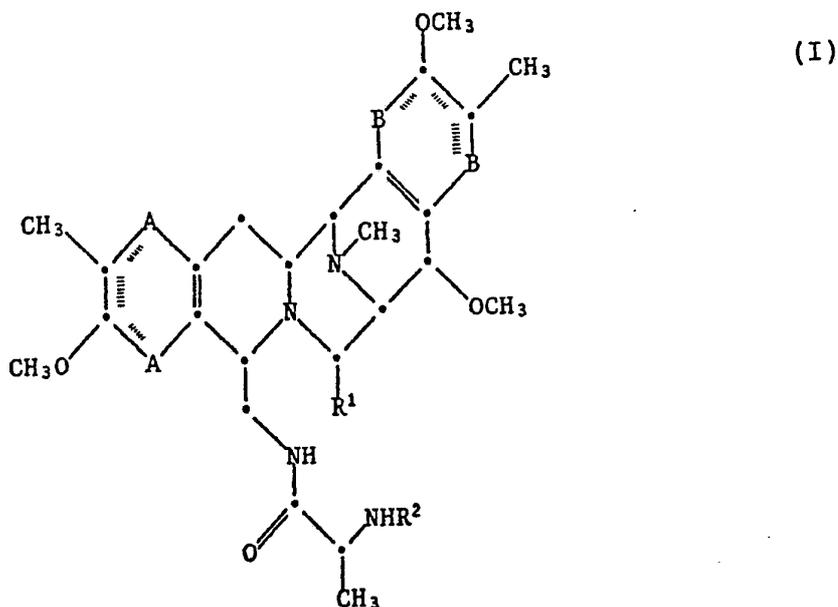
$R^2$  representa hidrogénio ou acilo e

A e B. independentemente um do outro. representam cada qual C=O ou C-OH. e em que a linha pontuada representa uma ligação dupla C=C na posição da ligação intermédia quando A ou B representa C=O. ou na posição das duas ligações laterais quando A ou B representa C-OH. por fermentação de um novo microorganismo da especie Myxococcus xanthus.

Refere-se ainda ao microorganismo em si mesmo a preparações farmaceuticas que contem os novos compostos. e à utilização dos novos compostos como antibióticos e como agentes inibidores de tumores e para produção de preparações farmacêuticas.

O invento diz respeito a novos alcalóides policíclicos possuindo propriedades antibioticas. a um processo para a preparação destes compostos mediante fermentação de um novo microorganismo da especie Myxococcus xanthus. ao proprio microorganismo, a preparações farmaceuticas contendo os novos compostos, e à utilização dos novos compostos como antibioticos e como agentes inibidores da formação de tumores e para a produção de preparações farmaceuticas.

O invento diz especialmente respeito a compostos de formula



em que

R<sup>1</sup> representa hidrogenio ou hidroxi. R<sup>2</sup> representa hidrogênio ou acilo e A e B. independentemente um do outro, representam cada qual C=O ou C-OH. e em que a linha ponteada representa uma ligação dupla C=C na posição de ligação do meio quando A ou B representa C=O. ou na posição das duas

ligações das extremidades quando A ou B representa C-OH e a sais de tais compostos. em especial a sais farmacêuticamente aceitáveis.

Os compostos de fórmula I de acordo com o invento são aparentados dos compostos isolados de Streptomyces lavendulae. que são apelidados de saframicinas. Na Patente dos EUA no.4 248 863, por exemplo descreve-se a preparação por meio de fermentação das saframicinas A. B. C. D. e E. e na Patentes dos EUA No.4 372 947 descreve-se a preparação da saframicina S. A estrutura das saframicinas conhecidas é descrita por T. Arai, *Anti-microbial Agents and Chemotherapy* 28, 5 (1985). De acordo com esta publicação. os compostos de formula I de acordo com o invento diferem das saframicinas conhecidas pelo menos no radical alanilona cadeia lateral, em vez do qual, nas saframicinas conhecidas. se encontra o radical acilo de ácido pirúvico ou outro radical acilo, e diferem também além disso. no significado do radical R<sup>1</sup> e no grupo metoxi no núcleo bicíclico. em que foi estabelecida uma ponte.

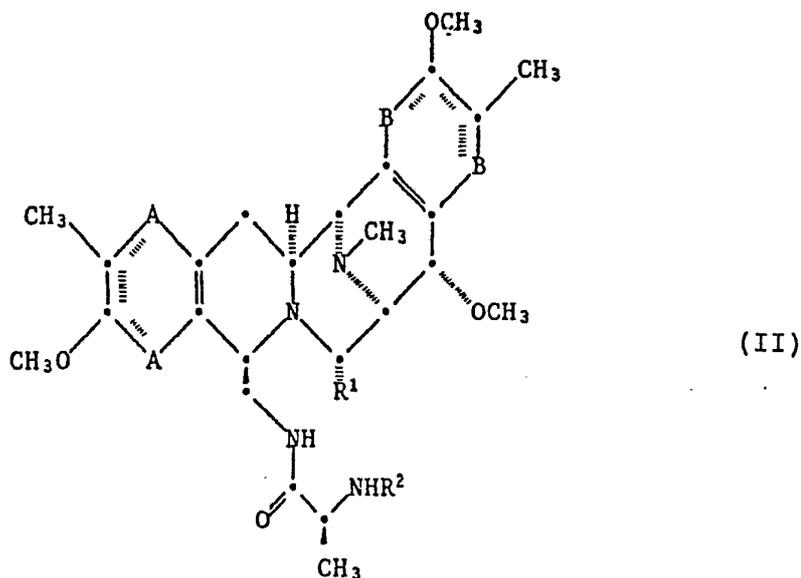
Derivados de saframicina com um radical alanilo na cadeia lateral são descritos no Pedido de Patente Europeia No. EP 173 649. mas diferem dos compostos de acordo com o invento no significado do radical R<sup>1</sup> e por um grupo metoxi inexistente.

Os antibióticos Y-16482 e B que são obtidos por fermentação de uma estirpe de pseudomonas Fluorescens. são descritos no Pedido de patente Europeia No. EP 55 299. Segundo Y. Ikeda et al *J. Antibiotics* 36, 1284 (1983). estes compostos também denominados soframicinas estão intimamente relacionados com as saframicinas e também

portanto com os compostos de fórmula I de acordo com o invento. Todavia, as safracinas diferem dos novos compostos quanto ao significado de B (um dos composto/grupo B é C-H) e pelo facto de não existir um grupo metoxi no núcleo bicíclico em que se estabeleceu uma ponte.

Outros compostos aparentados podem ser isolados a partir do fungo Reniera sp. Estes compostos denominados renieramicinas por J.M.Faulkner, J. Am. Chem. Soc. 104, 265 (1982) diferem dos compostos de fórmula I de acordo com o invento pelo menos na cadeia lateral, que, em vez de alanilaminometil, é (Z)-2-metil-2-butenoiloximetil (um éster de ácido angélico) nas renieramicinas.

A configuração nos centros quiral dos compostos de fórmula I de acordo com o invento não é conhecida com absoluta certeza. Indicações quanto às configurações relativas nos vários centros quiral emergem, contudo, do "Nuclear Overhauser Effect": (efeito Overhauser Nuclear) nos espectros de ressonância nuclear protónica e da análise da alanina libertada durante a hidrólise. Por analogia com a configuração absoluta conhecida, determinada por análise estrutural de raios-X, de saframicina C (T. Arai et al., Tetrahedron Letters 1979, 2355) e de saframicina A com bromo (I. Ueda et al., Acta Cryst. C 40, 1578 (1984)), é de admitir que os compostos de acordo com o invento têm a seguinte estrutura especial, de acordo com a fórmula



Em compostos de fórmulas I e II,  $R^2$  representa hidrogenio ou acilo.  $R^2$  é acilo, é, em especial, o grupo acilo um semiester de acido carboxilico ou acido carbonico com átomos de carbono em numero que pode ir ate vinte. por exemplo  $C_1-C_{20}$ -alcanoílo,  $C_2-C_7$ -alcanoílo substituído com hidroxí, oxo ou halogenio, aroílo ou  $C_1-C_7$ -alcoxicarbonilo.

$C_1-C_{20}$  -alcanoílo é de preferencia  $C_1-C_7$ -alcanoílo. por exemplo formilo, acetilo, propionilo. n-butirilo. 2-metilpropionilo. n-pentanoílo, 2,2-dimetilpropionilo. 2-metilbutirilo. 3-metilbutirilo ou n-hexanoílo. ou  $C_8-C_{20}$ -alcanoílo de cadeia linear com um número par de átomos de carbono. por exemplo n-octanoílo, n-decanoílo. n-dodecanoílo. n-tetradecanoílo, n-hexadecanoílo. n-octadecanoílo ou n-icosanoílo.  $C_2-C_7$  -alcanoílo substituído com hidroxí, oxo ou halo. é, por exemplo, trifluoroacetilo. mono- di- ou tricloroacetilo. glicolóilo, gliceroílo. lactoílo. glioxiloílo ou piruvoílo. Aroílo é, por

por exemplo. benzoilo ou 1- ou 2-naftoilo em que o anel fenilo ou naftilo pode estar substituído com nitro, amino, halogenio. por exemplo cloro ou bromo, hidroxi e/ou com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alcoxi. por exemplo metoxi. por exemplo 4-nitrobenzofilo. 3.5-dinitrobenzoilo. antraniloilo. 2,6-diclorobenzoilo saliciloilo. galoilo ou 2-, 3- ou 4-anisoilo, C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-alcoxicarbonilo é. por exemplo, metoxi-, etoxi-, n-propoxi-, isopropoxi-, n-butoxi-, isobutoxi-, ou terc.-butoxicarbonilo.

O radical R<sup>2</sup> acilo preferido é C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> -alcanoilo. em especial. acetilo. São preferidos os compostos de formula I em que R<sup>1</sup> representa hidrogenio ou hidroxi. R<sup>2</sup> representa hidrogenio. A repreesnte C=O, e B repreesnta C=O ou C-OH e a linha ponteadada tem o significado atrás mencionado. e aos sais farmaceuticamente aceitáveis de tais compostos.

São tambem preferidos os compostos de formula I em que R<sup>1</sup> representa hidroxi. R<sup>2</sup> representa hidrogenio. A representa C-OH e B representa C-OH e a linha ponteadada tem o significado atrás mencionado, e tambem os compostos de formula I em que R<sup>1</sup> repreesnta hidroxi. R<sup>2</sup> repreesnta acetilo. A representa C=O e B representa C=O e a linha ponteadada tem o significado atrás mencionado. e aos sais farmaceuticamente aceitaveis destes compostos.

O invento diz especialmente respeito a compostos de formula I em que R<sup>1</sup> representa hidrogenio ou hidroxi. R<sup>2</sup> representa hidrogenio. A representa C=O e B repreesnta C-OH e a linha ponteadada tem o significado atrás mencionado. e aos sais farmaceuticamente aceitaveis

de tais compostos.

No que se segue, os compostos de acordo com o invento são chamados saframicina Mx 1 ( $R^1 = OH$ ) e saframicina Mx 2 ( $R^1 = H$ ). Sem qualquer referencia estes nomes indicam compostos de formula I em que A é C=O e B e C-OH. Com a referencia "BC" (bis-quinona) estes nomes são usados para compostos em que A representa C=O e B representa C=O. A saframicina Mx 1 BHC(bis-hidroquinona) é um composto de formula I em que  $R^1$  é OH,  $R^2$  é hidrogenio A é C-OH e B é C-OH. A referencia "acilo" indica compostos correspondentes em que  $R^2$  representa acilo.

Os sais de compostos de formula I de acordo com o invento são, em especial, sais de adição de ácidos não tóxicos farmacologicamente aceitáveis. São exemplos de sais de adição de ácido com ácidos não tóxicos, fisiologicamente bem tolerados, sais com ácidos inorgânicos por exemplo ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, ou com ácidos inorgânicos carboxílicos, sulfônicos ou sulfo, por exemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminossalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-carboxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico ou isonicotínico e também aminoácidos, por exemplo aminoácidos, bem como ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido 2-hidroxietanossulfônico, ácido etano-1,2-dissulfônico, ácido benzenossulfônico, ácido 4-metilbenzenossulfônico ou ácido naftaleno-2-sulfônico, ou com outros compostos orgânicos ácidos, tal como ácido ascórbico.

Para efeitos de isolamento ou purificação. é também possível usar sais que não são farmacologicamente adequados.

Os compostos de fórmula I são de acordo com o invento e os seus sais farmacologicamente aceitáveis possuem valiosas propriedades farmacológicas. Por exemplo. os compostos de fórmula I em que A representa C=0 são eficazes. em concentrações baixas que vão de 0.004 µg/ml a 0.3 µg/ml. em relação a várias bactérias, por exemplo. em relação a Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis. Micrococcus luteus e Escherichia coli. Para além de propriedades antibióticas. os compostos possuem também propriedades inibitórias da formação de tumores, por exemplo em relação aos tumores experimentais leucemia L 1210/S2. carcinoma pulmonar humano MBA 9812. adenocarcinoma do colon 26 e reticulosarcoma M5076.

Se murganhos com leucemia L 1210/S2 forem tratados com injeções intraperitoneais de 2,5 ou 5 mg/kg de saframicina Mx2 durante quatro dias sucessivos, o seu tempo de vida é significativamente prolongado por um factor igual ou superior a 1.6. Se tratados com quatro injeções de 0.625. 1.25 ou 2.5 mg/kg de saframicina Mx 1, o seu tempo de vida é prolongado por um factor igual ou superior a 1.7. A saframicina Mx2 em 7 doses diárias intraperitoneais de 2.5 ou 5.0 mg/kg reduz significativamente o peso do carcinoma pulmonar humano MBA 9812, implantado experimentalmente em murganhos sem pelo balb/c, para um valor igual ou inferior a 62%. em comparação com animais não tratados.

A dose única máxima tolerável de saframicina Mx1 e Mx2 em murganhos é de 12,5 mg/kg e superior a 25 mg/kg. respectivamente.

O invento diz também respeito a processos para a preparação de compostos de fórmula I. Compostos de fórmula I são produzidos fazendo crescer a estirpe Mx x48 da espécie Myxococcus xanthus, ou um mutante obtido a partir desta que produza compostos de fórmula I, numa cultura contendo compostos de carbono e azoto e sais inorgânicos essenciais numa forma facilmente assimilável a uma temperatura entre 15°C e 40°C e um pH entre 5 e 9, sob condições aeróbicas, isolando os compostos de fórmula I resultantes e, caso tal seja desejado, convertendo um composto de fórmula I resultante num composto de fórmula I diferente e/ou convertendo um composto resultante num sal e/ou convertendo um sal resultante no composto livre ou num sal diferente.

O invento diz também respeito ao microorganismo Myxococcus Xanthus, estirpe Mx x48. Foi isolada de uma amostra de terra do Oásis Gabis, na Tunísia e registada na National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Colecção Nacional de Bacterias Industriais e Marinhas), Aberdeen, Escócia, sob o numero NCIB 12 268.

A estirpe Mx x48 tem a capacidade de dar origem espontaneamente a mutantes naturais que produzem compostos de fórmula I. Mutantes artificiais podem, por exemplo, ser produzidos quimicamente, por exemplo, mediante tratamento com compostos que causam alquilação ou azotação, por exemplo N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ou com um nitrito alcalino, tal como nitrito de sodio, ou mediante irradiação, por exemplo com radiação de alta energia tal como radiação ultravioleta, raios-X ou radioactividade. O invento diz também respeito aos mutantes da estirpe Mx x48 que produzem compostos de fórmula I.

No processo de produção de compostos de formula I. o microorganismo Myxococcus xanthus, estirpe Mx x48 é cultivado sob condições adequadas.

O meio de cultura usado tem de conter uma fonte de carbono e azoto e tambem sais inorgânicos essenciais. São fontes de carbono e azoto aminoácidos, peptidos e proteínas e tambem os produtos da degradação destes, tal como peptona ou triptona e tambem extractos de carne, cereais pulverizados, por exemplo milho, ou trigo, leguminosas, em especial soja, farinha de peixe, sementes, por exemplo de algodoeiro, residuos de destilação obtidos no processo de produção de álcool extracto de levedura, etc. Os sais inorganicos essenciais existentes na solução nutritiva podem ser, por exemplo, cloretos carbonatos, sulfatos, fosfatos de metais alcalinos ou de metais alcalino-terrosos, por exemplo, sodio, potassio, magnésio e cálcio, e tambem sais de ferro, zinco, manganésio molibdeno e cobre. A cultura é realizada de preferencia em meio liquido, especialmente em meio aquoso.

Um meio de cultura líquido adequado é, em especial, MD1 (0.3% de peptona a partir de caseína digerida tripticamente; 0.05% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Outros meio de cultura líquidos adequados consistem, por exemplo, em 0.05% de peptona a partir de caseína, 0.05% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , a que podem ser adicionados, caso se deseje, 0.05% de proteína de célula única, licor de macerado de milho, extracto de levedura, hidrolisato de aminoácidos de caseína, ou proteína a partir de farinha de peixe.

A cultura faz-se a temperaturas

entre 15<sup>o</sup>C e 40<sup>o</sup>C. de preferencia a temperaturas entre 25<sup>o</sup>C e 35<sup>o</sup>C. por exemplo. a cerca de 30<sup>o</sup>C. São valores de pH adequados aqueles que se situam entre 5 e 9, de preferência entre 6.5 e 8.5.

A cultura pode ser realizada em etapas. por exemplo mediante uma unica ou varias adições de solução nutritiva. ou pode ser realizada de modo contínuo. pela adição continua de solução nutritiva. De preferência a cultura é realizada em varias etapas, como se segue: primeiro. produz-se uma pré-cultura por exemplo, num dos meios de cultura referidos (inoculum), o qual, após fermentação durante um ou dois dias. é usado para inocular uma cultura de maiores dimensões. por exemplo. numa diluição na proporção de 1:10 a 1:500. Esta cultura pode, por sua vez. apos fermentação durante dois ou três dias, ser usada para inocular uma cultura principal de dimensões ainda maiores. por exemplo numa diluição na proporção de 1:10 a 1:1000.

A primeira pré-cultura pode também ser obtida mediante o crescimento durante varios dias da estirpe Mx x48 num meio de cultura solido ou líquido, por exemplo agar contendo um dos meios de cultura líquidos referidos. São meios de cultura adequados, por exemplo, 1.5% de agar. 0.1% de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. contendo 0,5% de fermento de padeiro ou 0.3% de peptona a partir de caseína e extracto de levedura.

O decurso da fermentação pode ser seguido analiticamente mediante a realização de amostragens durante a fermentação. por exemplo. mediante a medição do valor de pH da cultura que. durante a fermentação aumenta de cerca de pH 7.2 para cerca de pH 8,0 mediante

a medição da densidade optica que é uma medida do crescimento da estirpe. gravimetricamente, determinando o peso seco da biomassa formada. mediante cromatografia de camada fina. mediante cromatografia liquida de alta pressão e fase invertida ou mediante determinação da actividade antibiotica dos componentes contidos no filtrado da cultura. Por exemplo. o material sobrenadante da cultura isento de células. sob a forma nao diluída ou diluída, pode ser testado num teste de difusão de agar relativamente Staphylococcus aureus.

O isolamento dos compostos de formula I de acordo com o invento do licor de cultura é realizado de acordo com metodos em si mesmo conhecidos, tendo em conta as suas propriedades químicas, fisicas e biologicas. Cromatografia de camada fina. por exemplo em gel de silica com clorêto de metileno/metanol, cromatografia de alta pressao. por exemplo em gel de silica de fase invertida e/ou a actividade relativamente a Staphylococcus aureus no teste de difusão em agar. podem ser usadas para determinar a concentração dos compostos de acordo com o invento nas etapas individuais do processo de isolamento.

Para isolar os compostos de acordo com o invento do licor de fermentação em bruto, este é agitado. de preferênciã durante varias horas, com resinas de adsorção não ionicas macroporosas, por exemplo, com resinas sinteticas possuindo uma estrutura básica aromática, por exemplo copolimeros de estireno/divinilbenzeno.

Tais resinas podem ser caracterizadas segundo varias parâmetros estatisticos usuais, por exemplo volume dos poros. área superficial especifica, volu

me medio dos poros. diâmetro de poros de maior frequência distribuição das dimensões dos poros. distribuição das dimensões das partículas. entre outros. Resinas de adsorção adequados têm poros com um volume entre cerca de 0,5 e cerca de 4.5 ml/g. uma área superficial específica entre cerca de 100 e 1000 m<sup>2</sup>/g e um diâmetro médio dos poros entre cerca de 4 e cerca de 130 nm. e existem no mercado. por exemplo. sob os nossos comerciais AMBERLITE<sup>®</sup> XAD-1, XAD-2. XAD-4. XAD-1180 e ER 180 de Rohm & Haas, DIAION<sup>®</sup> HP-10. HP-20. HP-21. HP-30. HP-40. HP-50, de Mitsubishi DUOLITE<sup>®</sup> S-861. S-862. S-863 e ES-866 de Dia-Prosium IMAC<sup>®</sup> Syn 46 e Syn 72 de Akzo Chemie, KASTEL<sup>®</sup> S-111, S-112, S-114 de Montedison. LEWATIT<sup>®</sup> OC. 1031 de Bayer e RELITE<sup>®</sup> ADS de Resindion.

Após separação do licor de fermentação da resina de adsorção. por exemplo. mediante passagem por um crivo. esta é lavado com água e depois eluida com um solvente organico ou uma mistura de agua e um solvente organico que seja inerte em relação à resina de adsorção usada. por exemplo isopropanol. Os eluatos são. caso seja desejado. tratada um ácido orgânico ou inorganico, e concentrados no vacuo.

E tambem possivel processar a mistura de fermentação de um modo convencional. O licor de cultura é. com este fim em vista. separado da biomassa de um modo usual. por exemplo mediante filtração ou centrifugação. e o filtrado da cultura é extraído com um solvente organico que não é miscível oué apenas levemente miscível com agua. por exemplo cloreto de metileno, cloroformio ou. de preferencua. acetato de etilo. A concentração mediante evaporação no vacuo dá origem a um extracto em bruto. Dividindo o extracto em bruto entre as duas fases

de um sistema consistindo em dois solventes orgânicas imiscíveis. por exemplo metanol/heptano. os produtos de fermentação. em especial os compostos de formula I de acordo com o invento. acumulam-se na fase polar.

Os extractos em bruto são purificados de preferencia por metodos cromatográficos, por exemplo mediante cromatografia numa substancia de permuta ionica possuindo grupos funcionais acidicos, por exemplo, numa substancia de permuta ionica possuindo grupos carboxi mediante cromatografia de adsorção de/ou partiçãp e/ou cromatografia liquida de alta presão em superficies não polares. por exemplo em gel de silica contendo grupos alquilo em longas cadeias ("fase invertida")("reversed phase") ou em agarose com grupos alquilo ou fenilo ( "interacção hidrofóbica" ("hydrophobic interaction"). São tambem adequados outros metodos cromatograficos por exemplo. cromatografia de afinidade. "cromatografia liquida de pressão rápida", ("fast pressure liquid chromatography") e tambem distribuição contracorrente por exemplo "cromatografia contracorrente de goticulas" ("droplet countercurrent chromatography") ou cromatografia contracorrente rotacional ("rotational locular countercurrent chromatography").

São veiculos adequados para cromatografia de permuta ionica polimeros organicos, por exemplo agarose de ligações cruzadas. dextrano. poliacrilamida, copolimero de estireno/divinilbenzeno ou celulose. De preferência. um tal material possui grupos funcionais levemente acidicos. por exemplo grupos carboxi. São substancias de permuta ionica preferidas os veiculos de dextrano de ligações cruzadas contendo radicais carboxialquilo, por exemplo, radicais carboximetilo. tais como os que existem no mercado sob o nome comercial de CM-Sephadex<sup>®</sup>.

Um material de permuta ionica pos-  
suindo grupos carboxi é pré-tratado numa solução tampão  
aquosa adequada. por exemplo uma adsorção tampão com um pH  
entre 5 e 7. por exemplo tampão fosfato pH5. Depois são  
adicionados os extractos em bruto contendo os compostos de  
acordo com o invento. por exemplo mediante colocação destes  
extractos numa coluna contendo o material de permuta ioni-  
ca pre-tratado. As substâncias e impurezas que se seguem  
nao tivessem ligado sao extraidas mediante lavagem da colu-  
na de permuta ionica com solução tampão. caso seja necessario  
sob pressão. e as saframocinas são eluidos da coluna usando  
soluções tampão que contém uma concentração crescente de  
sal. por exemplo. tampão fosfato de pH 5 contendo concentra-  
ções crescentes de cloreto de sodio. A cromatografia de  
permuta ionica descrita pode. caso seja desejado, ser tam-  
bem realizada em colunas adequadas para cromatografia liqui-  
da de alta pressão.

São veiculos adequados para cromatografia de adsorção e partição. por exemplo. polimeros orga-  
nicos. por exemplo agarose. dextrano ou celulose com liga-  
ção cruzadas. Os dextransos com ligações cruzadas que podem  
possuir grupos funcionais adequados. por exemplo grupos  
hidroxialquilo. sao preferidos para a purificação dos safra-  
micinas por meio de cromatografia de adsorção e partição.  
E especialmente preferido um dextrano com ligações cruzadas  
que possui grupos hidroxipropilo e que existe no mercado  
sob o nome de comercial de Sephadex<sup>®</sup> LH-20.

De preferencia. os extractos pré-  
purificados mediante cromatografia de permuta ionica são  
introduzidos numa coluna contendo um veiculo que possui  
grupos hidroxipropilo e eluidos com misturas de solventes

orgânicos de composição constante ou variável. São usados de preferência metanol ou misturas de metanol com um outro solvente orgânico de baixa polaridade, por exemplo cloreto de metileno, com a adição de um ácido orgânico, por exemplo ácido fórmico ou acético, por exemplo uma mistura de metanol/cloreto de metileno contendo aproximadamente 0,1% de ácido acético. Tal como acontecia na cromatografia de permuta iônica, também a cromatografia de adsorção e partição pode ser realizada em colunas adequadas para cromatografia líquida de alta pressão.

Para separar os compostos de fórmula I, extractos pré-purificados mediante cromatografia de permuta iônica e/ou cromatografia de adsorção são submetidos de preferência a uma cromatografia líquida de alta pressão numa superfície não-polar, a chamada cromatografia de "fase invertida". O veículo usado é de preferência um veículo baseado em gel de sílica possuindo grupos alquila em longas cadeias, por exemplo grupos alquila com 14 a 22 átomos de carbono, por exemplo 18 átomos de carbono.

Tais veículos podem ser obtidos no mercado sob nomes comerciais HD-Sil<sup>®</sup> 18-10-60, Nucleosil<sup>®</sup> C-18, Bio-Sil<sup>®</sup> ODS-10 ou Hi-Pore<sup>®</sup> RP-318. A mistura de saframocinas a ser tratada é introduzida numa coluna de cromatografia líquida de alta pressão e a fase invertida e processada em soluções orgânicas aquosas contendo ácido, por exemplo em misturas de água com metanol, acetonitrilo ou tetrahydrofurano contendo um ácido orgânico sulfônico, por exemplo ácido heptanossulfônico, ácido trifluoroacético ou um ácido inorgânico fraco, por exemplo fosfato de dihidrogênio. Preferem-se as misturas metanol/água com a adição de tampão fosfato pH 6.5.

A purificação dos extractos em bruto pode também ser levada a cabo mediante cromatografia de distribuição contracorrente. por exemplo mediante "cromatografia contra-corrente de gotículas". São fases aquosas adequadas soluções tampão levemente ácidas, por exemplo soluções tampão de pH entre 4 e 7. de preferência fosfato pH 5. A fase orgânica usada é. por exemplo, um clorohidrocarboneto. por exemplo cloroformio ou cloreto de metileno, com o qual se mistura. caso seja desejado, um álcool inferior. por exemplo n-butanol. iso- ou n-propanol, ou metanol, de preferência uma mistura de cloreto de metileno e isopropanol.

Um composto de fórmula I é convertido num composto de fórmula I diferente por métodos que são em si mesmo conhecidos. por exemplo mediante oxidação redução ou acilação.

A conversão de uma hidroquinona (A e/ou B representam C-OH) na quinona correspondente (A e/ou B representam C=O) por oxidação e a conversão de uma quinona numa hidroquinona por redução. pode ser realizada por exemplo. de modo análogo aos processos que são descritos em "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)", 4th edition. volume VII/3a. "(Métodos de Química Orgânica)", Thieme Verlag. Estugarda 1977. São agentes suaves de oxidação adequados. por exemplo. sais de metais e óxidos de metais, por exemplo óxido de prata (I) em éter dietílico, benzeno ou tolueno na presença de um agente secante, por exemplo sulfato de sódio. sais de ferro (III), tal como cloreto de ferro (III) em água ou etanol aquoso. sais de cobre ou sais de talio. por exemplo trifluoroacetato de talio (III). Um outro agente de oxidação adequado é o oxigénio atmosférico

numa solução neutra. por exemplo. numa solução tampão de pH entre 7 e 8. São agentes de redução adequados, por exemplo. hidrogenio na presença de catalisadores heterogéneos, por exemplo. oxido de platina ou paládio sobre carbono, ou catalisadores homogeneos. por exemplo cloreto de tris(trifosfina) ródio (I). e também hidretos metálicos, por exemplo borohidretos. tal como borohidreto de sodio ou hidretos de aluminio. tal como hidreto de aluminio e litio, sais redutores. por exemplo ditionito de sodio. e também luz na presença de um dador de hidrogenio. por exemplo, a luz ambiente e metanol. A conversão de quinonas e hidroquinonas umas nas outras pode também realizar-se por métodos electroquímicos. por exemplo electrólise em soluções salinas levemente ácidas. por exemplo soluções tampão de pH entre 4 e 6.

A acilação de um composto de formula I em que  $R^2$  representa hidrogenio é levada a cabo de acordo com métodos em si mesmo conhecidos, por exemplo, com um ácido da formula  $R^2-OH$  ou com um derivado funcional reactivo desse ácido.

Quando se usa um ácido carboxílico livre para a acilação. a reacção tem vulgarmente lugar na presença de um agente de condensação adequado, por exemplo, uma carbodiimida. por exemplo dicitclohexil- ou, de preferencia. N-etil-N'-3-dimetilaminopropilcarbodiimida. A condensação é realizada numa mistura solvente organica aquosa ou num tampão aquoso com um pH proximo da neutralidade, por exemplo. entre 6 e 8. facultativamente com arrefecimento ou aquecimento e numa atmosfera de gás inerte, por exemplo sob azoto.

Um derivado funcional reactivo de um acido carboxílico ou de um semi-éster de acido carbónico

é um anidrido correspondente. por exemplo um anidrido simétrico. por exemplo anidrido acético, um anidrido misto do ácido  $R^2-OH$ . com um ácido inorgânico ou orgânico, por exemplo. com um ácido halídrico. tal como ácido clorídrico ou ácido bromídrico. isto é. por exemplo. um cloreto de ou brometo de ácido carboxílico. ou um éster de ácido clorofórmio, ou um anidrido misto de um ácido carboxílico com um semiéster de ácido carbónico. por exemplo. o semiéster etílico ou isobutilico de ácido carbónico. Um outro derivado funcional reactivo de um ácido carboxílico ou de um semiéster de ácido carbónico é. por exemplo. um éster activado. por exemplo um N-hidroxiéster. tal como o éster com N-hidroxipiperidina. N-hidroxisuccinimida. N-hidroxiftalimida ou 1-hidroxibenzotriazole.

As reacções de acilação com derivados funcionais reactivos de  $R^2-OH$  são realizadas de preferéncia em misturas solventes orgânicas aquosas funcionais/homogéneas ou de duas fases. caso seja desejado, com arrefecimento ou aquecimento ligeiro. por exemplo, numa gama de temperaturas entre cerca de  $0^{\circ}C$  e cerca de  $40^{\circ}C$ , de preferéncia a uma temperatura próxima da temperatura ambiente. e. facultativamente. numa atmosfera de gás inerte, por exemplo sob azoto. Neste caso adiciona-se um aceitador de ácido. por exemplo uma base orgânica adequada, por exemplo. uma amina. por exemplo trimetilamina, trietilamina, N-metilmorfolina. 1.5-diazabicyclo [4.3.0]non-5-eno, 1.8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno ou piridina, ou uma base inorgânica. por exemplo um hidróxido de metal alcalino ou de metal alcalino terroso. por exemplo hidróxido de sódio. potássio ou cálcio. um carbonato de metal alcalino, ou de metal alcalino-terroso. por exemplo carbonato de sódio, hidrogenocarbonato de sódio ou carbonato de cálcio, ou um fosfato de metal alcalino. por exemplo fosfato ou hidrogenofosfato de sódio ou potássio. De preferéncia, a reacção

de acilação é realizada num tampão aquoso com um valor de pH próximo da neutralidade. por exemplo, entre 6 e 8, assumindo a base do tampão o papel de aceitador de ácido. Para inibir a acilação de um grupo hidroxifenólico A e/ou B e, onde tal for aplicável, de um grupo hidroxil  $R^1$ , por exemplo, o álcool, por exemplo metanol ou etanol, é adicionado à mistura solvente orgânica aquosa.

Sais de compostos de fórmula I podem ser preparados de um modo em si mesmo conhecido, por exemplo fazendo reagir o composto livre com, de preferência, quantidades estequiométricas ou um pequeno excesso de ácido que dá origem à formação de um sal de adição de ácido.

Os sais podem ser convertidos nos compostos livres de modo usual, por exemplo, mediante tratamento com uma quantidade equimolar de uma base livre, por exemplo um hidróxido, tal como um hidróxido alcalino, por exemplo hidróxido de lítio, potássio ou sódio, um hidróxido alcalino-terroso, por exemplo hidróxido de cálcio ou hidróxido de magnésio ou um hidróxido de amónio, por exemplo hidróxido de amónio não substituído ou hidróxido de benziltrimetilamónio, ou uma amina orgânica terciária, por exemplo trietilamina. Deve notar-se, todavia, que o composto livre de fórmula I tem apenas uma limitada estabilidade e, para efeitos de armazenamento, tem de ser convertido num sal de adição de ácido.

Os sais de compostos de fórmula I são convertidos noutros sais de um modo em si mesmo conhecido. De preferência, a conversão de sais noutros sais é realizada com materiais de permuta iónica que são

carregados com o anião desejado, ou mediante cromatografia de adsorção num solvente que contem o ácido do sal de adição de acido desejado em excesso.

O invento diz tambem respeito às execuções do processo em que um extracto obtido em qualquer etapa do isolamento é usado como material de partida e as restantes etapas são levadas a cabo, o processo é interrompido em qualquer etapa e/ou um composto obtido de acordo com o processo com o invento é ainda adicionalmente processado in situ.

Os compostos do presente invento e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser usados, por exemplo, para a produção de preparações farmacêuticas que contêm uma quantidade eficaz do ingrediente activo de preferencia misturado com uma quantidade significativa de veiculos farmacêuticamente aceitáveis, inorgânicos e /ou orgânicos, solidos ou liquidos. O presente invento diz tambem respeito a preparações farmacêuticas à sua produção e uso.

As preparações farmacêuticas de acordo com o invento são adequados para administração oral, ou de preferencia parentérica, por exemplo intravenosa, intramuscular ou tópica.

Por exemplo, os ingredientes activos de formula I do presente invento são usadas sob a forma de preparações ou soluções de infusão que podem ser administradas por via intravenosa, intramuscular, intradérmica, ou subcutânea.

Tais soluções são, de preferencia soluções ou suspensões aquosas isotônicas que podem ser preparadas antes da sua utilização. por exemplo, a partir de preparações liofilizadas contendo apenas o ingrediente activo ou o ingrediente activo juntamente com um veiculo, por exemplo dextrano. manitol ou albumina. As preparações farmaceuticas para utilização oral podem ser, caso se deseje, ser esterilizadas. e podem conter adjuvantes, por exemplo conservantes. estabilizantes. agentes molhantes e/ou emulsio nantes. agentes de solubilização. sais para a regulação da pressão osmótica e/ou soluções tampão. São também adequa das as suspensões oleosas parainjecção. nas quais solventes ou veiculos lipofilicos. por exemplo. óleos gordos, por exemplo. óleo de sesamo. triglicéridos, ou ésteres de áci dos gordos sinteticos. por exemplo oleato de etilo, são usados como veiculos.

As preparações farmaceuticas in- jectáveis que. caso seja desejado. podem conter outras subs tâncias farmacologicamente valiosas. por exemplo outros in gredientes activos. contêm entre cerca de 0,1% a 100%, em especial entre 1% e 50%. e. no caso de liofilizatos, até 100%. do ingrediente activo.

São veiculos adequados para pre- parações orais. por exemplo drageias. comprimidos, ou com- primidos revestidos com laca. em especial agentes de enchi mento. tal como açucares. por exemplo lactose. sacarose, manitol ou sorbitol. preparações de celulose e/ou fosfatos de calcio. por exemplo fosfato de tricálcio ou hidrogenofos fato de cálcio. agentes ligantes. tal como pastas de amido, a base de. por exemplo. amido de milho trigo, arroz ou ba- tata. gelatina. metilcelulose. hidroxipropilmetilcelulose,

hidroxipropilcelulose. e/ou polivinilpirrolidona e/ou, caso seja desejado. agentes de desintegração, tal como os amidos atras referidos. e também carboximetilamido, polivinilpirrolidona com ligações cruzadas. agar. ácido algínico ou um seu sal. tal como alginato de sódio, ou carboximetil<sup>a</sup> celulose de baixo peso molecular. São adjuvantes em especial os agentes de regulação do fluxo e os lubrificantes, por exemplo. sílica. talco. ácido esteárico. ou seus sais, tal como estearato de magnésio ou cálcio. e/ou polietilenoglicol.

Os núcleos das drageias são providas de revestimentos que podem ser resistentes aos sucos gástricos. Outras preparações farmacêuticas administráveis oralmente são as cápsulas cheias d seco. de gelatina, e capsula moles seladas. de gelatina e um agente plástico. tal como glicerina ou sorbitol. São preparações farmacêuticas administráveis por via rectal adequadas, por exemplo. supositórios que consistem numa condição/combinção do ingrediente activo com um material de base para supositórios.

As preparações administráveis por via oral e rectal contêm cerca de 0.1% e cerca de 50%. em especial entre cerca de 1% e cerca de 10% do ingrediente activo e. caso seja desejado. outros compostos farmacologicamente valiosos.

As preparações farmacêuticas para utilização tópica são. em especial. os cremes, geles, unguentos. pastas. espumas. tinturas e soluções que contêm entre cerca de 0.05% e cerca de 10%. em especial entre cerca de 0.5% e cerca de 5% do ingrediente activo.

As preparações farmacêuticas são produzidas de um modo em si mesmo conhecido, por exemplo mediante processo de dissolução, suspensão, mistura ou liofilização convencionais descritos na farmacopeia.

O invento diz também respeito à utilização dos compostos de fórmula I ou de seus sais como medicamentos, por exemplo sob a forma de preparações farmacêuticas para o tratamento de infecções de origem bacteriana causadas por bactérias gram-positivas e para o tratamento de tumores, especialmente tumores pulmonares e gastro-intestinais e leucemia, em animais de sangue quente, por exemplo em seres humanos e outros mamíferos, mediante a administração por via entérica, por exemplo oral, de preferência parentérica, de doses terapêuticamente eficazes.

De acordo com a espécie, idade, estado individual, gravidade da doença e método de administração as doses diárias entre cerca de 0,01 mg e cerca de 10 mg, em especial entre cerca de 0,1 mg e cerca de 1 mg, por quilograma de peso corpóreo, de acordo com aquilo que o médico que receitou o tratamento achar conveniente.

Os exemplos que se seguem ilustram o invento, não pretendendo todavia limitar de modo algum o seu âmbito.

Exemplo 1

Bacteria Myxococcus xanthus Mx x48

a) Origem e disponibilidade da estirpe usada no processo de produção

A bactéria Myxococcus xanthus, estirpe Mx x48 da família Myxococcaceae da ordem Myxobacterales foi isolada em Maio de 1980 de uma amostra de solo do Oasis Gabes. na Tunisia. A estirpe MxX48 foi depositada na National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Colecção Nacional de Bacterias Industriais e Marinhas), Aberdeen. Escocia. em 26 de Maio de 1986. sob o no. NCIB 12 268 para efeitos de acordo de patente com o tratado de Budapeste.

b) Descrição da estirpe usada no processo de produção

Pequenos bastonetes vegetativos, cilindricos. com as extremidades abruptamente afiladas, com forma de charuto.  $0.8 \times 3.5-5 \mu\text{m}$ . movem-se sobre superficies de um modo que é um misto de rastejar e deslizar. Em meios adequados. por exemplo VY/2-agar (ver adiante), o organismo forma na superficie de agar "corpos multiplicantes" ("fruiting bodies"). com 50-150  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sob a forma de gotas. vesiculas ou capítulos moles e pegajosos com uma cor que pode ir do vermelho alaranjado intenso até ao azul acinzentado. No interior destes existem myxoesporos esfericos 1.8-1.9  $\mu\text{m}$ . em diâmetro. que refractam fortemente

a luz. As colônias tendem a espalhar-se como "enxames" flutuantes sobre a superfície de agar, podendo atingir dimensões de vários centímetros. Nalguns meios, têm uma cor que pode ir de amarelo esverdeado intenso ao laranja.

c) Condições de Cultura

O organismo desenvolve-se bem em agar de peptona, por exemplo CY-agar (0,3% de Casitone / Difco) 0,1% de extracto de levedura / Difco) 0,1% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5% de agar, pH 7,2).. ou em agar de levedura por exemplo, VY/2 agar (0,5% de levedura de padeiro, com base no peso quando fresca 0,1% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5% de agar pH 7,2). Em meios líquidos Mx X48 cresce em suspensões celulares homogêneas tanto em frascos mantidos sob agitação (a 160 revoluções/mim. aproximadamente) como em bioreactores. Um meio de cultura adequado é, por exemplo MD1 1.m. 0,3% de peptona a partir de caseína, digerida tripticamente (Merck, Damstadt) 0,2% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,2). A estirpe Mx X48 é estritamente aeróbica.

Todas as culturas são mantidas a 30°C. O tempo necessário para o aparecimento de uma nova geração em MD1 1.um. é de aproximadamente 6,5 horas ( $\mu = 0,15$  por hora). A densidade óptica máxima conseguida (623 nm, distância percorrida pela radiação na célula a 1cm) situa-se entre 1,3 e 1,5. A concentração da peptona a partir da caseína pode também ser aumentada, por exemplo, para 0,5 ou 1%. O tempo necessário para o aparecimento de uma nova geração não varia neste caso, mas, em contrapartida, a densidade óptica aumenta para aproximadamente 2 ou 3,5

respectivamente. A medida que aumenta a concentração de peptona, todavia, a produção de antibiotico relativamente à produção em MD1 1.m. São também meios de cultura adequados para o crescimento da estirpe com a formação de antibioticos. os seguintes: 0.05% de casitona, 0,2% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0.05% de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . pH 7,2, contendo ou 0.5% de Probion S (proteína de célula única Hoechst) ou 0,5% de licor de macerado de milho ou 0,5% de Protaminal (concentrado de proteínas de peixe. Asta) ou 0,5% de extracto de levedura ou 0.3% de acidos de casamino (Difco).

d) Possiveis métodos de conservação

1. Mediante congelamento de células vegetativas de culturas em pratos ou líquidos numa solução de peptona a  $-80^{\circ}C$  (viável durante varios anos) 2. Mediante secagem dos corpos multiplicantes ("fruiting bodies) sobre papel de filtro (viável durante varios anos à temperatura ambiente). 3 Mediante secagem dos corpos multiplicantes ("fruiting bodies") em leite, e armazenamento sob azoto à temperatura ambiente em ampolas seladas ao calor (viável durante varios anos). 4. Mediante suspensão de células vegetativas de culturas em pratos ou líquidas em solução de peptona e congelamento em azoto liquido (viável durante varios anos ).

## Exemplo 2

### Preparação de material sobrenadante celular com actividade antibiotica

---

#### a) Condições de Produção:

E possível detectar a actividade contra Staph. aureus no final de fase de crescimento logaritmico (densidade óptica 0.9-1). usando o teste de difusão de agar em frascos agitados. A actividade mais intensa é obtida no inicio da fase estacionaria. O pH da cultura é. nessa altura. de cerca de 8. e após incubação aumenta para cerca de 8.5 sem que a densidade optica aumente mais. No final da fase estacionaria. em contrapartida, as células acumulam-se e ocorre o fenomeno de lise celular. A actividade antibiotica volta neste caso a decrescer.

#### b) Produção num aparelho de fermentação

1. Pré-cultura: 50 ml de MD1 1.m. são inoculados com 0,5 ml e mantidos a 30°C e 160 revoluções/min durante 2 dias.

2. Pré-fermentação: um bioreactor de 25 litros, produzido por Braun. Melsungen e possuindo um sistema de pás para agitação. é cheio com meio MD1 1.m. e inoculado com a pré-cultura (no.1). A temperatura é mantida a 30°C. A velo-

cidade de rotação do agitador é de 200 revoluções/mim e o arejamento de  $0.1 \text{ Nm}^3/\text{h}$ . Sem quaisquer outras alterações a fermentação efectua-se ao longo de um periodo de 66 horas. Após este intervalo de tempo obtém-se uma densidade óptica (623 nm) de 1.1 e um pH de 7.9.

3. Fermentação Principal: um bioreactor com uma capacidade de 700 litros. produzido por Giovanola. Monthey, Switzerland Suíça e possuindo um sistema de pás para agitação é cheio com meio MD1 1.m. Após inoculação com o produto de pré-fermentação (nº.2). são regulados uma velocidade de rotação de 150 revoluções/mim e um arejamento de  $1 \text{ Nm}^3/\text{h}$ . Aumentando o arejamento e a velocidade de rotação mantém-se a pressão parcial de oxigenio acima de 60% do valor de saturação no decorrer do processo de cultura. Após 50 horas obtem-se uma densidade optica de 1.3 e um pH de 8. O material sobrenadante da cultura contém agora o antibiotico. No teste de difusão em agar contra Staph. aureus, uma aureóla de inibição (aproximadamente 7 mm de diâmetro) que está no limite da visibilidade. é obtida quando o sobrenadante da cultura é diluido na proporção 1:64.

### Exemplo 3

#### Isolamento e Purificação das Saframocinas

##### a) Processamento de uma fermentação de 700 litros

Quando termina a fermentação do

Exemplo 2b). 4.0 litros de resina XAD, ER-180<sup>®</sup> (comercializada por Röhm & Haas) são introduzidas no licor de cultura. A mistura é agitada lentamente durante 5 horas. A resina é separada das células em que não há antibiótico e do meio usando um crivo. É transferida para uma coluna de cromatografia e eluída de uma só vez com 12 litros (1 litro/hora/ de isopropanol. Mais de 90% do complexo antibiótico é eluído com os primeiros 6 litros de isopropanol. Adiciona-se imediatamente 0.1% (v/v) de ácido acético às frações contendo saframocinas e o todo é concentrado num evaporador rotativo em frascos de vidro castanho. O extracto de XAD concentrado pesa 72 g.

As saframocinas MX1 e MX2 são derivados de hidroquinona/quinona básicos, sensíveis à luz e à oxidação, que são estáveis apenas a valores de pH inferiores a 7. A purificação é por isso realizada de modo substancial, com a exclusão de luz e a valores de pH próximos de 5. O armazenamento temporário das frações contendo a substância faz-se em recipientes de vidro castanho, e o armazenamento a longo prazo faz-se a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### b) Purificação das saframocinas

O extracto em bruto é dissolvido em 300 ml de tampão fosfato pH 5 0.07M e introduzido numa coluna aberta cheia com 1 litro de CM-Sephadex<sup>®</sup> C-25 inchado, comercializado por Pharmacia em tampão fosfato pH 5 0.07 M. Em primeiro lugar, qualquer material que não tenha sido adsorvido é eluído com 2 litros de tampão fosfato. Numa outra etapa, o material fracamente adsorvido é retirado por lavagem com 1 litro de tampão fosfato pH 5

0.07M/ cloreto de sodio 0.2M. O complexo antibiotico é eluido da coluna completamente usando 2 litros de tampão fosfato pH5 0.07M/NaCl 0.5M. sendo visivel a migração de uma banda amarelada. Após concentração do eluato e extracção repetida do residuo com etanol. obtem-se aproximadamente 2.5 g de material altamente activo. Este contem ainda residuos do sal fosfato.

Para remoção do sal realiza-se cromatografia numa coluna de Sephadex<sup>®</sup> LH-20 com metanol e 1% de acido formico ou acido acetico como eluente, sendo o fosfato substituido por formato ou acetato, respectivamente. Impurezas basicas ainda existentes no eluato, tal como 2-feniletilamina e 2-(4-hidroxifenil)-etilamina sao eliminadas por cromatografia em Sephadex<sup>®</sup> LH-20 com diclorometano/metanol 1:1/1% de acido formico ou acido acetico. Obtem-se 700 mg de um produto que, de acordo com uma analise com base em cromatografia liquida de alta pressão (Nucleosil<sup>®</sup> C-18. 7.5 um. metanol/água 60:40/ácido heptanossulfônico 0.005M) contem como produtos principais as duas saframincinas Mx1 e Mx2. e tambem os derivados de bis-quinona saframicina Mx1BC e Mx2 BC e o derivado de bis-hidroquinona Mx1 BHC.

c) Separação das saframincinas

A mistura de saframicina é separada por meio de cromatografia liquida de alta pressão em HD-Sil<sup>®</sup> 18-10-60 (comercialização por Organogen, 25cm x 16mm) com metanol/água 1:1/0.5% de tampão formato de trietilamonio pH 6.0. com um fluxo de 25 ml/min. Mx1 é eluida após 6,4 minutos e Mx2 após 9.2 minutos.

Ambas as substancias são obtidas sob a forma de oleos castanho-avermelhadas viscosos. O componente secundaria Mx1 BHC é eluído antes de Mx1, e os componentes secundarios Mx1BC e Mx2BC são eluidos por esta ordem depois de Mx2.

EXEMPLO 4: Caracterização das Saframincinas

a) Saframincina Mx 1 e Mx 2

Saframincina Mx 1 (R<sup>1</sup> = OH) Saframincina Mx 2 (R<sup>1</sup> = H)

COMPORTAMENTO COM ELUIÇÃO EM CAMADA FINA (Valores Rf)

Gel de sílica 60F 254 acetato de etilo 0 0  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1 0,23  
CH<sub>3</sub>OH 0,47  
RP-18 Nano-Sil C<sub>18</sub>-100 CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 4:1 0,67

Reacção de cor em CCF idêntica para ambas as saframincinas: Ninhidrina: vermelho-violeta,  
Dragendorff : castanho avermelhado. hidroxilamina/cloreto de ferro (III): amarelo vivo. 254 nm:  
extinção de fluorescência.

TEMPO DE RETENÇÃO DE CLAP EM HD-Sil 18-10-60

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 3:2/0.005M C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>SO<sub>3</sub>H : 4,97 min. 6,38 min.

ESPECTRO UV λ<sub>max</sub> (log ε) . c = 2 em CH<sub>3</sub>OH 273 nm (3.95) 273 nm(3,97)

ROTACÇÃO OPTICA λ<sub>D</sub> 25

-70,7° -119,8°

EXEMPLO 4 (cont)

Espectro iV sob a forma de película

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)  
(sh = shoulder)

Saframicina	Saframicina
Mx 1 (R <sup>1</sup> = OH)	Mx 2 (R <sup>1</sup> = H)
3200, 2900,	3200, 2900,
1657, 1619(sh),	1680(sh), 1656,
1459, 1300,	1623(sh), 1461,
1236, 1158.	1236, 1159, 1122.

FAB-MS Alcance dos íões negativos  
Alcance dos íões positivos

ANALISE ELEMENTAL

Formula Empirica:

Valores Teoricos

Valores Experimentais:

m/e 568 (M-OH)-H	-
monofosfato.H <sub>2</sub> O	m/e 569 M-H <sup>+</sup> monofosfato. H <sub>2</sub> O
C <sub>29</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>14</sub> P (702.7)	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> (640.67)
C 49,56 H 6,17 N 7,97 %	C 56,20 H 6,60 N 8,70 %
C 50,17 H 6,33 N 7,66 %	C 56,36 H 6,70 N 8,94 %

ESPECTRO RMN: 15mg de monofosfato em 0.5 ml de CD<sub>3</sub>OD

s = singleto d= dubleto. t=tripleto. q=quarteto. m= multiplete. dd=dubleto duplo  
 ddd = dupleto triplo

<sup>1</sup> H-RMN	Saframicina Mx 1	Saframicina Mx 2		
Protao	(ppm)	(ppm)	Constantes de acoplamento (Hz)	Constantes de acoplamento (Hz)
1-H	4,33 s	3,59 m	(1-4b) 3,0; (1-22a) 0,5;	(1-4a) 1,5; (1-4b) 3,5;
3-H	3,50 ddd	3,12 ddd	(1-22b) 2,5;	(1-22a) 3,6; (1-22b) 1,5;
4-H <sub>a</sub>	3,12 dd	3,04 ddd	(3-4a) 2,5; (3-4b) 11;	(3-4a) 3; (3-4b) 11;
4-H <sub>b</sub>	1,51 ddd	1,59 ddd	(3-11) 1,0;	(3-11) 3;
11-H	4,75 dd	4,90 dd	(4a-4b) 17,5;	(4a-4b) 18;
12-CH <sub>3</sub>	2,84 s	2,88 s	(11-13) 1,0;	(11-13) 1,5;
13-H	4,20 s	4,13 d	(13-14) 2,8;	
14-H	4,82 d	4,95 s	(13-21) inferior a 0,5;	(21a-21b) 13; (21a-13) 3;
21-H <sub>a</sub>	4,78 s	3,71 dd		
21-H <sub>b</sub>	-	3,71 d		
22-H <sub>a</sub>	3,77 dd	4,09 dd	(22a-22b) 14,0;	(22a-22b) 14,5;
22-H <sub>b</sub>	3,25 dd	3,34 dd		
24-H	3,69 q	3,68 q	(24-25) 7,0;	(24-25) 7,1;

11

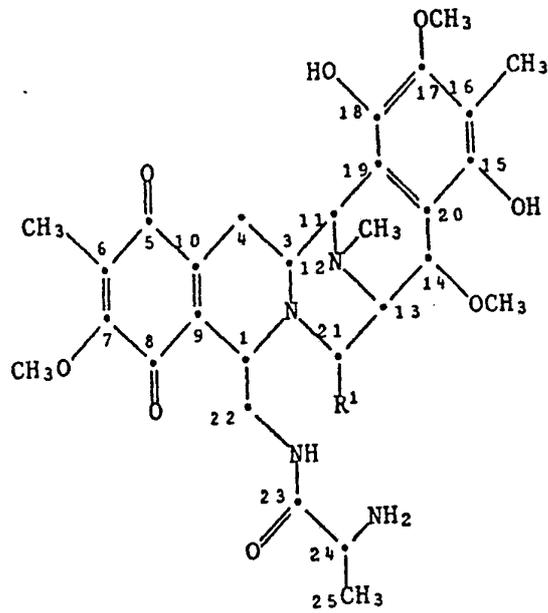
(CONT)

<u><sup>1</sup>H-RMN</u>	Saframicina Mx1	Saframicina Mx 2
Protao	(ppm) Constantes de acoplamento	(ppm) Constantes de acoplamento)
25-H <sub>3</sub>	0,93 d	0,82 d
7-OCH <sub>3</sub>	4,02 s	4,02 s
17-OCH <sub>3</sub>	3,75 s	3,75 s
14-OCH <sub>3</sub>	3,72 s	3,69 s
16-CH <sub>3</sub>	2,25 s	2,26 s
6-CH <sub>3</sub>	1,93 s	1,93 s

11

$^{13}\text{C}$ -RMN	Saframicina Mx 1	Saframicina Mx 2
Atomo de C	(ppm)	(ppm)
1	54,63 d	61,11 d
3	51,80 d	57,07 d
4	25,60 t	26,19 t
5	186,95 s	187,17 s
6	129,33 s	128,87 s
7	157,23 s	157,37 s
8	182,77 s	182,91 s
9	143,10 s	143,04 s
10	138,43 s	137,63 s
11	58,19 d	58,15 d
12-CH <sub>3</sub>	42,15 q	41,39 q
13	59,98 d	59,38 d
14	72,98 d	75,39 d
15	147,16 s	146,58 s
16	123,44 s	123,36 s
17	148,07 s	147,75 s
18	142,74 s	143,04 s
19	112,20 s	113,04 s
20	119,36 s	120,75 s
21	89,23 d	54,44 t
22	41,39 t	39,36 t
23	170,85 s	170,65 s
24	50,02 d	49,85 d
25	17,16 q	17,08 q
6-CH <sub>3</sub>	8,76 q	8,81 q
16-CH <sub>3</sub>	9,87 q	9,98 q
7-OCH <sub>3</sub>	61,45 q	61,04 q
17-OCH <sub>3</sub>	61,02 q	61,44 q
14-OCH <sub>3</sub>	58,19 q	58,07 q

*[Handwritten signature]*



b) Saframicinas Mx 1 BC Mx 2 BC e Mx 1 BHC

Saframicina  
Mx 1 BC

Saframicina  
Mx 2 BC

Saframicina  
Mx 1 BHC

Comportamento em eluição em camada fina (Valores Rf)

Gel de sílica 60 F 254	acetato de etilo CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH 9:1	0	0,53	0,51	0,56
RP-18 Nano-Sil C <sub>18</sub> -100	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O 4:1	0,61			

Tempo de retenção de CLAP em HD-Sil 18-10-60

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 3:2/0.005M C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>SO<sub>3</sub>H

10,86 min

3,5 min

Espectro UV

λ<sub>max</sub> (log ε)

264 nm (4,32)

291 nm

<sup>1</sup>ESpectro <sup>1</sup>H- δ (ppm) em. CD<sub>3</sub>OD

4,05 and 4,04 (cada s,3H, 7-OCH <sub>3</sub> ) e 17-OCH <sub>3</sub> )	4,05 and 4,02 (cada s,3H, 7-OCH <sub>3</sub> ) e 17-OCH <sub>3</sub> )	3,78 (s,3H, 17-OCH <sub>3</sub> )
3,59 (s,3H, 14-OCH <sub>3</sub> )	3,59 (s,3H, 14-OCH <sub>3</sub> )	3,70 (s,6H, 7-OCH <sub>3</sub> ) e 14-OCH <sub>3</sub> )
2,47 (s,3H, 12-CH <sub>3</sub> )	2,46 (s,3H, 12-CH <sub>3</sub> )	2,95 (s,3H, 12-CH <sub>3</sub> )
2,00 (s,3H, 16-CH <sub>3</sub> )	2,00 (s,3H, 16-CH <sub>3</sub> )	2,27 (s,3H, 16-CH <sub>3</sub> )
1,94 (s,3H, 6-CH <sub>3</sub> )	1,94 (s,3H, 6-CH <sub>3</sub> )	2,17 (s,3H, 6-CH <sub>3</sub> )
1,28 (d,3H, 25-H <sub>3</sub> )	1,29 (d,3H, 25-H <sub>3</sub> )	1,22 (d,3H, 25-H <sub>3</sub> )

11

Exemplo 5

Conversão de saframicinas

a) Oxidação de saframicina Mx 1 para dar origem a Mx 1 com oxigenio atmosferico

10 mg de saframicina Mx 1 (sob a forma do monofosfato) são dissolvidos em 2 ml de tampão fosfato pH 7.3 e o todo é agitado durante 20 minutos num recipiente aberto. O valor do pH é ajustado para cerca de 6 com ácido fosfórico diluido e a solução é concentrado sob vacuo obtido com uma bomba de oleo. O residuo é recolhido repetidamente em isopropanol. permanecendo neste os sais do tampão. A solução de isopropanol contem 9,5 mg de saframicina Mx 1BC. A saframicina Mx2 é oxidada para dar origem a saframicina Mx 2 BC de modo analogo.

b) Redução de saframicina Mx 1 para dar origem a Mx 1BHC com hidrogenio:

Num recipiente de hidrogenação, 10 mg de saframicina Mx 1 (sob a forma de monofosfato) são dissolvidos em 0.5 ml de metanol e 0.5 ml de agua, uma ponta de espátula de paládio sobre carbono activado (10% de Pd) é adicionada e o todo é gitado durante 10 minutos numa corrente fraca de hidrogenio. O catalisador é subsequentemente retirado por meio de filtração sob uma atmosfera de azoto e a solução que contem 10 mg de Mx 1 BHC. é concentrada.

A saframicina Mx 1 BHC é instável e instalavel e é re-oxidada de um modo que é específico em relação a determinadas regiões para dar origem a saframicina Mx 1 quinona/hidroquinona em presença de oxigenio atmosferico.

C ) Acetilação de Saframicina Mx 1

15 mg de saframicina Mx 1 são dissolvidos em 2 ml de metanol e 2 ml de tampão fosfato pH 7.3. 0.05 ml de anidrido acetico são adicionados e o todo é agitado de um dia para o outro à temperatura ambiente. A solução de reacção é concentrada . recolhida numa pequena quantidade de água e introduzida numa coluna de XAD-2.

O sais são retirados mediante lavagem com 2 volumes de leite de agua. O produto é depois eluido com um volume de leite de metanol. A solução de metanol contendo 15 mg de acetil-saframicina Mx 1BC é concentrada no vacuo.

Espectro UV em metanol :  $\lambda_{\text{max}}$  266 nm.  $\log \epsilon$  4,32

FAB-MS in positive ions range:

teorico : m/e 627 (M + H)<sup>+</sup>

Encontrado: m/e 613 (100%),  $[M + 2 \times H - 1 \times O] + H^+$

m/e 615 (30%),  $[M + 4 \times H - 1 \times O] + H^+$

Resolução elevada para  $C_{31}H_{41}N_4O_9$

Teoria 613,2873.

Experimental: 613,2859

<sup>1</sup>H-RMN em CD<sub>3</sub>OD: 4,05 e 4,0 (cada s, 3H, 7-OCH<sub>3</sub> e 17-OCH<sub>3</sub>). 3,55 (s, 3H, 14-OCH<sub>3</sub>), 2,43 (s, 3H, 12-CH<sub>3</sub>), 2,00 (s, 3H, 16-CH<sub>3</sub>), 1,95 (s, 3H, 6-CH<sub>3</sub>), 1,75 (s, 3H, acetil-CH<sub>3</sub>), 1,10 (d, 3H, 25-H<sub>3</sub>).

### Exemplo 6

#### Determinação da concentração inibitória mínima das saframincinas Mx 1 e Mx 2.

Os organismos usados no teste, com uma densidade celular de  $10^5$  células/ml (Myxococcus xanthus:  $10^7$  células/ml) cada, são colocados no meio de nutrição, adequados em tubos de ensaio.

Os meios usados, para Myxococcus xanthus : MD 1 1.m. para outras bacterias : 0,5% de peptona a partir de caseína, digerida tripticamente (Merck); 0,5% de proteose-peptona (Difco), 0,1% de extracto de carne (Oxoid), pH 7; para as leveduras: 1% de bacto-peptona (Difco), 1% de extracto de levedura (Difco), 2% de glicerina, pH 6.3.

Uma sequencia de concentrações das saframincinas Mx 1 e Mx2 dissolvidas em metanol é adicionada às suspensões dos organismos usados no teste, e os tubos de ensaio são incubados por um periodo que pode ir de 18 a 40 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ .

As concentrações inibitorias minimas das saframincinas Mx 1 e Mx2 são indicadas no Quadro que se segue.:

<u>Organismo usado no Teste</u>	Saframicina Mx1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Saframicina Mx2 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<u>Staphylococcus aureus GBF 16</u>	0,004	0,5
<u>Bacillus subtilis DSM 10</u>	0,063	1
<u>Micrococcus luteus DSM 348</u>	0,001	0,063
<u>Escherichia coli CG 164</u>	0,08	5
<u>Escherichia coli tol C</u>	0,32	20
<u>Proteus morgani CG 166</u>	1,25	>20
<u>Myxococcus xanthus Mx x48</u>	20	não testado
<u>Saccharomyces cerevisiae GBF 26</u>	>20	>20

Em relação a Staph.aureus, as bis-quinonas Mx1 BC e Mx2 BC apresentam actividades semelhantes as de Mx1 e Mx2. A bis-hidroquinona Mx 1 BHC não é estável sob as condições do teste.

Exemplo 7

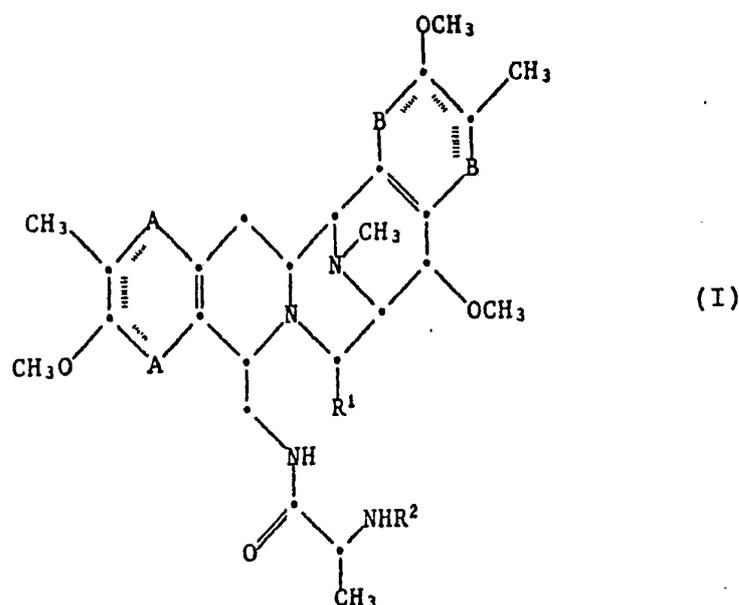
Preparações Farmaceuticas para Administraç:ao parenterica

Porções de 5 ml de uma solução aquosa esterilizada de 1% de saframicina Mx1 (sob a forma de monohidrato fosfato) são introduzidas sob condições assépticas em ampolas ou frasquinhos de 5 ml e secas por congelação. As ampolas ou frasquinhos são selados sob azoto e inspeccionados.

Soluções de saframicina Mx2, Mx1 BC. Mx 2BC. Mx 1 BHC e acetil-Mx 1 BC são processados de modo analogo.

REIVINDICAÇÕES

1ª.- Processo de preparação de compostos de formula



em que

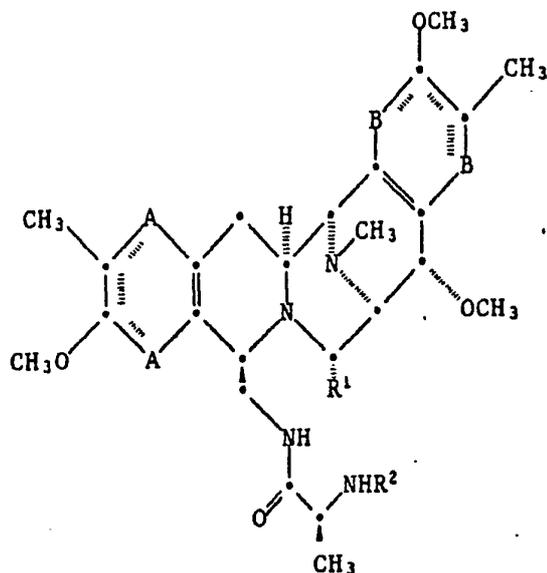
R<sup>1</sup> representa hidrogenio ou hidroxio. R<sup>2</sup> representa hidrogenio ou acilo e A e B. independentemente um do outro, representam cada qual C=O ou C-OH. e em que a linha pontuada representa uma ligação dupla C=C. na posição da ligação intermedia quando A ou B representa C=O, ou na posição das duas ligações laterais quando A ou B representa C-OH, e de sais de tais compostos. caracterizado por se fazer crescer a estirpe Mx x48 da especie Myxococcus xanthus, ou um mutante obtido a partir desta que produza os compostos de formula I. numa cultura contendo compostos de carbono e azoto e sais inorgânicos essenciais numa forma facilmente assimilavel a uma temperatura entre 15<sup>0</sup>C e 40<sup>0</sup>C e um valor de pH entre 5 e 9. sob condições aeróbicas, se isolar os

compostos de formula I resultantes, e, caso seja desejado, se converter um composto de fórmula I resultante num composto de formula I diferente e/ou se converter um composto resultante num sal e/ou se converter um sal resultante no composto livre ou num sal diferente.

2ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1. caracterizado por se isolar compostos de formula I do licor de fermentação em bruto mediante adsorção sobre resinas nao-ionicas macroporosas e purificação por métodos cromatográficos.

3ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2. caracterizado por se purificar compostos de formula I mediante cromatografia numa substancia de permuta iônica com grupos funcionais fracamente ácidos, cromatografia de adsorção ou partição e/ou cromatografia líquida de alta pressão em superficies não polares.

4ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1. 2. ou 3. caracterizado por se preparar compostos com a estrutura especial de acordo com a formula



(II).

5<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 1. 2. ou 3. caracterizado por se preparar compostos de fórmula I em que R<sup>1</sup> representa hidrogenio ou hidroxí. R<sup>2</sup> representa hidrogenio. A representa C=O e B representa C=O ou C-OH e a linha pontuada tem o significado atrás referido. e de sais farmacêuticamente aceitáveis de tais compostos.

6<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 1. 2 ou 3. caracterizado por se preparar compostos de fórmula I em que R<sup>1</sup> representa hidroxí, R<sup>2</sup> represent hidrogenio. A representa C-OH e B representa C-OH e a linha pontuada tem o significado atrás referido, e de sais farmacêuticamente aceitáveis deste composto.

7<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 1. 2 ou 3. caracterizado por se preparar com-

postos de fórmula I. em que R<sup>1</sup> representa hidrogenio ou hidroxí. R<sup>2</sup> representa hidrogenio. A representa C=O e B representa C-OH e a linha pontuada tem o significado atrás referido. e de sais farmacêuticamente aceitáveis destes compostos.

9ª.- A estirpe Mx X48 do micro-organismo Myxococcus xanthus. depositada na National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Colecção Nacional de Bacterias Industriais e Marinhas), Aberdeen, Escócia sob o numero NCTB 12 268. ou um mutante derivado dessa estirpe que produza um composto de fórmula I.

10ª.- Processo de produção de preparações farmacêuticas caracterizado por incluir compostos de fórmula I ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis de acordo com a reivindicação 1. opcionalmente em mistura com veiculos farmacêuticamente aceitáveis.

Lisboa. 13 de Agosto de 1987



J. PEREIRA DA CRUZ  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º  
1200 LISBOA