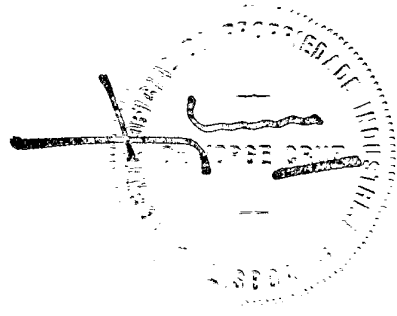


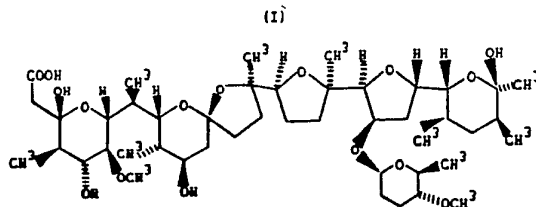
88.830



MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a produção do composto UK-61,689 de fórmula (I)



=====

PFIZER INC.

"PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO UK-61,689 E DE MICRO-ORGANISMOS ÚTEIS, PARA ESSE FIM"

a partir de mutantes de Actinomadura roseorufa, caracterizados pela capacidade em produzirem, por fermentação, UK-61,689, um antibiotico anticocicliaco de éter policiclico, acíclico, préviamente disponivel sómente por hidrolise ácida selectiva de UK-UK-58,852; e de Actinomadura roseorufa tendo as características identificadoras de ATCC 53666; ATCC 53665; ATCC 53664 e ATCC 53674.

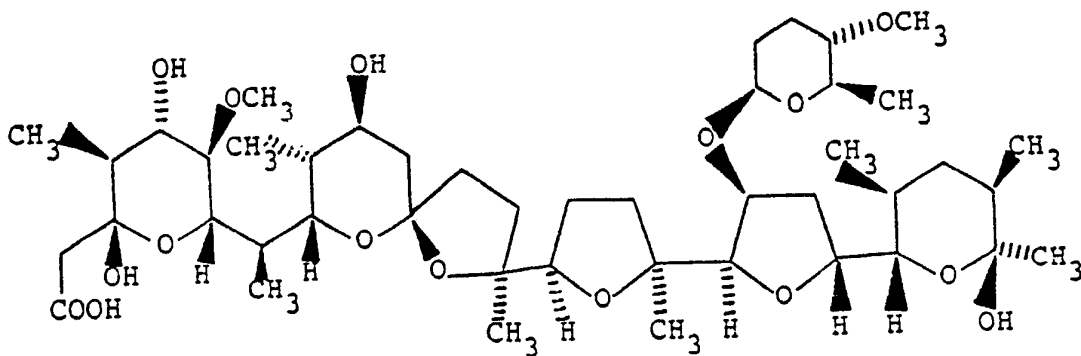
A fermentação é levada a efeito num meio nutriente contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos, sob condições de fermentação aerobica submersa, até se acumular no caldo total uma quantidade substancial do referido composto.



Este invento diz respeito a um processo microbiológico para produção de UK-61689, um antibiotico anti-coccidial de eter policidico acidico previamente disponivel sómente por meios quimicos. Mais particularmente diz respeito à produção fermentativa de UK-61689 por cultivo de Actinomadura roseorufa tendo as características identificadoras de ATCC 53666; e as mutantes Actinomadura roseorufa tendo as características identificadoras de ATCC 53665, ATCC 53664 e ATCC 53674.

EP-0169011, publicada em 22 de Janeiro de 1986 descreve a produção de UK-58852, num antibiotico de eter policiclico produzido por cultivo de Actinomadura roseorufa Huang sp. nov., ATCC 39697 num meio nutriente aquoso sob condições aerobicas submersas.

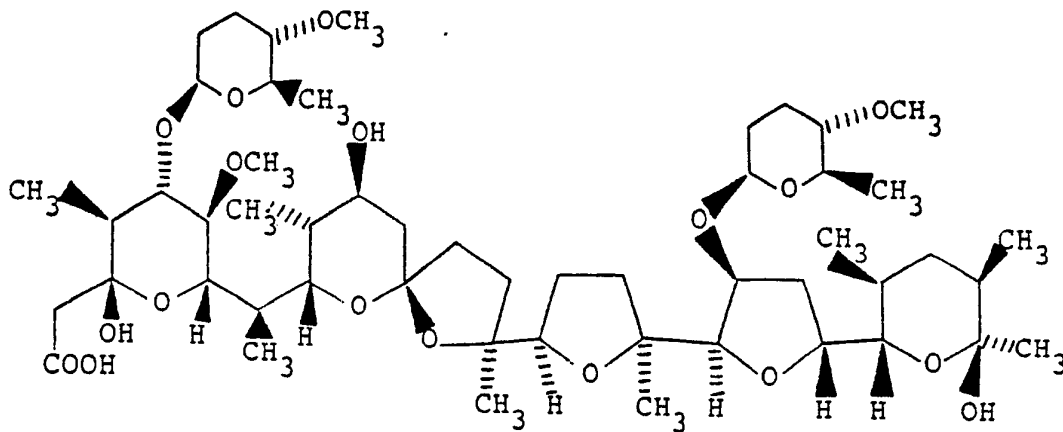
UK-61689 e um eter policiclico monoglicona acidico tem a fórmula (I),



(I)



A sua preparação pela hidrólise ácida selectiva de UK-58852, num éter diglicona políciclico tendo a fórmula (II),



(II)

é descrito na aplicação da Patente Britânica Nº 8618844, arquivada em 1 de Agosto de 1986. O processo aí descrito compreende a hidrólise ácida de UK-58852, usando preferivelmente 1:1 equivalentes de ácidos patoluenosulfónico por equivalentes do sal de sódio de UK-58852 em acetonitrilo/água como solvente à temperatura ambiente.

A preparação de UK-58852, ele próprio um antibiotico eficaz, especialmente agente anticoccidial, é

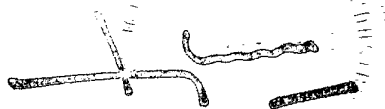
descrito na aplicação EP 169011, publicada em 22 de Janeiro de 1986. É produzido por fermentação aeróbica submersa em meio nutriente aquoso de Actinomadura roseorufa Huang sp. nov., ATCC 39697. Também produzido na fermentação com UK-58852 estão dois componentes menores relacionados, cada um dos quais é antibioticamente efectivo no controlo da coccidiose. Os dois componentes menores designados como CP-70228 e CP-70828, têm fórmula (II), acima, em que R e R¹ é metil, respectivamente.

Este invento diz respeito a processos microbiológicos para fabricar UK-61689, um antibiotico valioso de éter policíclico ácido e anticoccidial potente, o qual compreende a cultura de mutantes de Actinomadura roseorufa ATCC 53666 num meio nutriente aquoso sob, as condições aeróbicas, preferivelmente submersas. Diz especialmente respeito a mutantes ATCC 53674 e 53665 derivados de Actinomadura roseorufa ATCC 53666, os quais são caracterizados pela sua capacidade em produzir UK-61689 juntamente com UK-58852 e a um mutante de ATCC 53665, o qual é caracterizado pela sua capacidade em produzir 61689 substancialmente livre de UK-58852, tendo o referido mutante as características identificadoras de Actinomadura roseorufa ATCC 53664.

Os microorganismos produtores de UK-61689 e UK-58852 foram obtidos por mutação de uma nova estirpe de Actinomadura roseorufa, designada FD-27684, (ATCC 53666), isolada de uma amostra de solo recolhida em Yamae Village, Kamamoto, Japan. Usamos N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) como agente mutante. As colónias simples do microorganismo tratado foram a seguir examinadas para a produção de UK-61689. O produto geral compreende o crescimento de ATCC 53666 num meio nutriente aquoso sob condições aeróbicas submersas com agitação a uma temperatura de 28°C. A escolha do meio para o estágio de crescimento não é crítica num meio formado por cere

lose (10,0 g), amido de milho (5,0 g), infusão de licor de milho (5,0 g), NZ Amina YTT (5,0 g), (marca registrada para digestão enzimática da caseína, Humko Sheffield Chemical Co., Inc.), e cloreto de cobalto (0,002 g) é suspenso em um litro de água, pH ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio e distribuído (800 ml) num frasco Fernbach. Após esterilização por autoclave, os frascos são inoculados com uma suspensão de crescimento em ladeira ou micélio vegetativo congelado, e a seguir incubados com agitação num vibrador a cerca de 200 rev/min e numa temperatura de 28°C durante 8 dias. Uma parte alíquota de 50 ml é a seguir removida e o micélio homogenizado num almofariz com tecido Teflon seguido por fragmentação ultrasônica. Os micélios fragmentados foram a seguir centrifugados, lavados para retirar o meio e a seguir resuspenso em 50 ml de meio fresco num frasco Erlenmeyer de 300 ml, e incubados por agitação a 32°C durante duas horas após o que as células foram de novo centrifugadas, lavadas com água estéril para libertar o meio e suspensas em 50 ml de tampão tris(hidroximetil)aminometano-malato pH 9,0. Aliquotas desta suspensão foram a seguir tratadas com um agente NTG mutagênico a concentrações de 750 mcg/ml durante uma hora num agitador rotativo em banho de água a 250 a 300 rev/min., e uma temperatura de 34°C. Após tratamento as células foram centrifugadas, lavadas para ficarem sem mutagem com água estéril e suspensas em frascos do meio de crescimento fresco as quais cresceram por agitação a 32°C num agitador de cabine a 200 rev/min. Após três dias o crescimento das micélias foi homogenizado e sonicado. As alíquotas do sonicado foram serialmente diluídas, colocadas em lamelas de um meio nutriente sólido e as lamelas incubadas a 28°C. até as unidades formadoras de colônias serem de tamanho suficiente para transferência para planos inclinados. Um meio apropriado para lamelas e planos inclinados e o meio ATCC No. 172 com Amina NZ Tipo A (Humko Sheffield Chemical Co., Inc) diminuído para 1,0 g/l. Os planos inclinados inoculados foram deixados crescer a 28°C durante 10 a 14 dias após cujo

tempo eles estavam prontos para teste. Isto foi feito por inoculação de frasco Erlenmeyer de 300 ml contendo 25 ml de um meio apropriado (um tal meio contém cerelese, 45,0 g; farinha de soja, 10,0 g; infusão de licor de milho, 15,0 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g; cloreto de cobalto, 0,002 g; e carbonato de cálcio, 3,0 g; num litro de água e o pH do meio é ajustado a 7,0). Após esterilização por autoclave durante 30 minutos a $121^\circ C$, os frascos foram inoculados com suspensões individuais de crescimento em ladeira e incubados por agitação a $28^\circ C$ num agitador New Brunswick durante 7 dias. A cultura mutante FD-28454 (ATCC 53674) foi detectada examinando extractos de metilisobutilcetona de caldos da colheita global após lamelas cromatograficas de camada fina desenvolvidas por atomização (silica gel) com reagente vanilina e aquecimento a $100^\circ C$ durante cinco minutos. O sistema de desenvolvimento era composto de 9 partes de clorofórmio para uma parte de metanol o qual originou valores R_f de $\sim 0,3$ para UK-61689 e UK-58852. A relação UK-61689/UK-58852 parece variar de algum modo dependente das condições de fermentação. As características morfológicas e culturais do mutante assim obtido são substancialmente as descritas aqui para A. roseorufa ATCC 53666. As características de distinção deste mutante é a sua capacidade em produzir uma mistura de UK-61689 e UK-58852 na qual UK-61689 é o produto predominante. A cultura do mutante e isolamento do antibiótico UK-61689 pode ser efectuada sob condições análogas às empregadas nas fermentações anteriores originando antibióticos poliéter. Ver, por exemplo a Patente U.S. 4361649. A cultura toma preferivelmente lugar em meio nutriente aquoso preferivelmente sob condições aeróbicas submersas com agitação a uma temperatura de $24^\circ C$ até $36^\circ C$. Meio nutriente útil para a cultura inclui uma fonte de carbono assimilável tal como açúcares, amidos e glicerol; uma fonte de azoto orgânico tal como caseína, digestivo enzimático de caseína, farinha de soja, farinha de semente de algodão, farinha de amendoim, gluten do trigo, farinha de soja,



farinha de carne e farinha de peixe. Uma fonte de substâncias de crescimento tal como cereais solúveis, farinha de peixe, farinha de semente de algodão e extracto de fermento bem como sais minerais tal como cloreto de sódio e carbonato de cálcio e traços de elementos tal como ferro, magnésio, cobre, zinco, cobalto e manganésio podem também ser utilizados com resultados vantajosos. Se houver formação excessiva de espuma durante a fermentação, podemos adicionar agentes anti-espuma tal como óleos vegetais ou silicones ao meio de fermentação. A aeração do meio em vasos para crescimento submerso é preferivelmente mantida com um ritmo de 1/2 a 2 volumes de ar estéril por volume de caldo de fermentação por minuto forçado no caldo através de um atomizador. A agitação pode ser mantida por meio de agitadores geralmente familiar aos especialistas na arte de fermentação. A velocidade de agitação depende do agitador empregado. Um frasco de agitação é normalmente usado de 150 a 300 ciclos por minuto enquanto um fermentador é normalmente usado de 300 a 1700 revoluções por minuto. Condições asepticas devem, claro ser mantidas através da transferencia do organismo e durante o seu crescimento.

A inoculação para preparação do anti-biótico de acordo com este invento pode ser obtido empregando o crescimento de uma parte obliqua da cultura de garrafas Roux inoculadas com a cultura ou uma suspensão de micélia derretida da cultura. Um meio sólido próprio para o crescimento inicial do organismo em plano inclinados e garrafas Roux é o Meio ATCC No. 172. O meio liquido previamente mencionado no estudo mutacional é próprio para preparar a micélia vegetativa antes de congelar. O crescimento pode ser usado para inocular ou os frascos de agitação ou vasos de inoculação ou os vasos de inoculação podem ser semeados a partir de frascos de agitação. O crescimento máximo nos frascos de agitação é normalmente atingido em 4 a 8 dias, enquanto a inoculação em vasos submersos de inoculação será normalmente no periodo mais favorável em 4 a 5

dias.

O progresso da produção antibiótica durante a fermentação pode ser qualitativamente vigiado por cromatografia de camada fina após visualização por atomização com o reagente vanilina como previamente descrito ou a lamela desenvolvida pode também ser coberta com infusão de agar do interior do cerebro semeada com Bacillus subtilis e incubada a 37°C durante 16 horas para visualizar os antibióticos. A cromatografia de camada fina é também uma ferramenta útil para analisar a composição dos materiais em bruto e purificados extraídos a partir do caldo de fermentação. Um método HPLC empregando uma coluna C-18 microburaco 10 cm x 4,6 mm, uma fase móvel 40/200/760 carbonato de amônio 0,01 M/acetoneitrilo/metanol, empregando um detector de índice de refração para quantificar o valor de UK-61689 e UK-58852 co-produzido nos caldos de fermentação.

O antibiótico UK-61689 produzido por fermentação dos mutantes aqui descritos acumula-se no micélio e no caldo e pode ser separado e recolhido por extração de todo o caldo da colheita de fermentação não filtrado, i.e., o caldo global, com um solvente orgânico tal como clorofórmio, acetato de etil, metilisobutil cetona ou butanol ao pH que existe naturalmente. Alternativamente, para evitar problemas sérios de emulsão o micélio é separado e quer ele quer o caldo clarificado extraído individualmente com um solvente orgânico. Os extractos de solvente são a seguir concentrados num xarope fino e o UK-61689 puro obtido por cromatografia.

Um método típico de separação e recuperação do antibiótico é como se segue:

O caldo global da fermentação do mutante foi extraído com metilisobutil cetona. A evaporação do extracto in vacuo originou

um óleo avermelhado o qual foi dissolvido em acetato de etil e deitado numa coluna de silica gel. A coluna de silica gel foi a seguir eluida com acetato de etil e os eluatos examinados por cromatografia de camada fina. Juntamos as fracções contendo UK-61689 e evaporamos à secura. O UK-61689 assim obtido pode ser adicionalmente purificado por cristalização a partir de éter isopropilico.

O UK-61689 pode ser recolhido a partir da fermentação em associação com o micélio por evaporação de todo o caldo por métodos conhecidos, incluindo a secagem por atomização, ou por separação do micélio do caldo por filtração ou centrifugação. Os produtos miceliais assim obtidos compreendem UK-61689 sobre a superficie do micélio e nos seus intersticios tornando o micélio um suporte útil para UK-61689.

Uma colônia simples, designada FD-28474, do mutante FD-28454 acima descrito (ATCC 53674) foi ela própria submetida a mutagenese por NTG de acordo com o processo acima descrito para a preparação de FD-28454. Este processo deu origem a mais um mutante (FD-28499) o qual exhibe as características morfológicas e culturais de Actinomadura roseorufa ATCC 53666 e, claro está, do primeiro mutante produzido. No entanto, este mutante (FD-28499) difere dos mutantes FD-28454 e 28474 no facto de produzir UK-61689 substancialmente livre (i.e., <1%) de UK-58852. O mutante FD-28499 é cultivado da mesma maneira que é o mutante primeiro descrito (FD-28454) e o UK-61689 recolhido da fermentação como préviamente descrito.

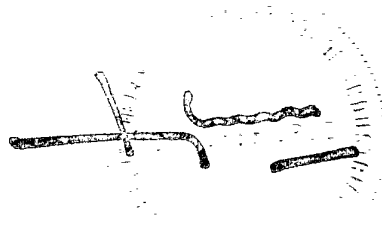
Este último mutante, identificado na colecção de cultura de Pfizer Inc. como FD-28499, mutantes FD-28454 e FD-28474, e o microorganismo de partida FD-27684, foram depositados sob os termos do Tratado de Budapeste na Ameri

can Type Culture Collection, Rockville, Maryland, um depositário reconhecido originando permanência dos depósitos e sua pronta acessibilidade ao público se uma patente for garantida sobre esta aplicação. Foram-lhes dadas as designações Actinomadura roseorufa ATCC 53664, ATCC 53674, ATCC 53665 e ATCC 53666, respectivamente. Os depósitos estão disponíveis, durante a pendência desta aplicação, a uma pessoa determinada pelo Comissário do United States Patent and Trademark Office, para isso autorizado sob o 37 CFR 1,14 e 35 USC 122, e de acordo com as leis de Patente estrangeiras em países em que as contra partes desta aplicação, ou a sua descendência, são arquivados. Todas as restrições sobre a disponibilidade para o público dos microorganismos depositados serão irrevogavelmente removidas após garantia de uma patente nela.

Investigações taxonomicas de FD-27684, FD-28474 e FD-28499 foram efectuadas por L.H. Huang que forneceu as descrições seguintes.

Cada uma das culturas foi plantada a partir de um plano inclinado no caldo ATCC nº172 e cresceu durante quatro dias a 28°C num agitador. Foi a seguir centrifugado durante 20 minutos, lavada três vezes com água estéril destilada e plantada num meio vulgarmente usado para identificação de membros de Actinomycetales.

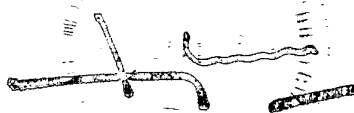
As culturas foram incubadas a 28°C e os resultados estavam prontos a tempos variáveis mas o mais vulgarmente foram tomados a 14 dias. As cores foram descritas na terminologia usual, mas as cores exactas foram determinadas por comparações com bocadinhos de cor do Color Harmony Manual, Quarta edição. O método de análise amino-ácido da célula global é o descrito em Becker et al., Appl. Microbiol., 12, 421-423,



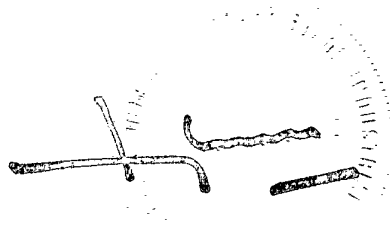
1964. Os açúcares da célula global foram analisados pelos métodos descritos em Lechevalier, J. Lab. Clin. Med., 71, 934-944, 1968; e em Stanek and Roberts, Appl. Microbiol. 28, 226-231, 1974. Para fins de comparação, usamos a cultura tipo Actinomadura roseorufa ATCC 39697.

O meio de identificação usado para a caracterização das culturas e referências à sua composição são como se segue:

- 1) Tryptone - caldo de extracto de Fermento - (meio ISP #1, Difco).
- 2) Extracto de Fermento - Extracto de Agar de Malte (meio ISP #2, Difco).
- 3) Agar de farinha de aveia - (meio ISP #3, Difco).
- 4) Sais inorganicos - Agar de Amido - (meio ISP #4, Difco).
- 5) glicerol - Agar de Asparagina - (meio ISP #5, Difco).
- 6) Peptona - Agar de Ferro de Extracto de Fermento - (meio ISP #6, Difco)



- 7) Czapek - Agar de Sacarose - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, meio nº 1, p.328, 1961.
- 8) Glicose - Agar Asparagina - Ibid, meio nº2, p.328.
- 9) Agar de Bennett - Ibid, meio nº30, p.331.
- 10) Agar de Emerson - Ibid, meio nº28, p.331.
- 11) Agar nutriente - Ibid, meio nº14, p.330.
- 12) Agar Tyrosine de Gordon e Smith - R.E. Gordon and M.M. Smith, J Bacteriol. 69: 147-150, 1955.
- 13) Agar de Caseina - Ibid.
- 14) Agar de Malato de Cálcio - S.A. Walkman, Bacteriol. Rev. 21: 1-29, 1957.
- 15) Gelatin - R.E. Gordon and J.M. Mihm, J Bacteriol. 73: 15-27, 1957.
- 16) Amido - Ibid.



- 17) Caldo de Nitrato Orgânico - Ibid.

- 18) Caldo de nitrato de Dextrose - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, meio nº.1, p.328, 1961, com 3g de dextrose substituídas por 30g de sacarose e agar omitido.

- 19) Agar de Batata cenoura - M.P. Lechevalier, J. Lab. anal Clinical Med. 71: 934 - 944, 1968, mas usa sómente 30g de batatas, 2,5g de cenouras e 20g de agar.

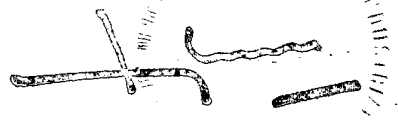
- 20) 2% de agar da Água da torneira

- 21) Agar Mineral #1 de Gauze - G.F. Gauze et al., Problems in the Classification of Antagtomistic Actinomycetes, English Ed., p.13, 1957.

- 22) Agar Orgânico #2 de Gauze - Ibid.

- 23) Espuma do Leite - Rifco.

- 24) Utilização da Celulose -
 - a) H.L. Jensen, Proc Linn. Soc. N.S.W. 55; 231-248, 1930.
 - b) M. Levine and H.W. Schoenlein, A Compilation of Culture Media, meio nº2511, 1930.



- 25) Utilização de Ácidos Orgânicos - R.E. Gordon et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 24: 54-63, 1974.
- 26) Produção de Ácidos a partir de Carbohidratos - Ibid.
- 27) Hidrólise de Hipurato e Esculina - Ibid.
- 28) Decomposição de Adenina, Hipoxantina, Xantina e Ureia - Ibid.
- 29) Resistência a Lisozima - Ibid.
- 30) Utilização de Carbohidrato - Meio C-2, H. Nonomura and Y. Ohara, J. Fermente. Technol. 49: 887-894, 1971.
- 31) Gama de temperatura - Meio ATCC 172 em ATCC Culture Collection Catalogue, 15th ed., p. 608, 1982.



Uma descrição da Cultura FD-27684

Agar de Extracto de Fermento - Extracto de Malte - Bom crescimento, cor de rosa - vermelho a vermelho (6 1/2 ia, 7 ia, 6 ia) elevado, enrugado, com micélio branco aéreo; vermelho inverso (7 ia); nenhuma pigmento solúvel.

Agar de farinha de aveia - Crescimento moderado, creme (2ca), levemente elevado, suave, ou aparecendo como colônias isoladas; micélio aéreo nenhum a raro, branco; creme inverso (2ca); nenhum pigmento solúvel.

Sais Inorgânicos - Agar de Amido - Crescimento pobre a moderado, incolor a creme (2ca), fino, liso; micélio aéreo nenhum a raro, branco; reverso o mesmo que na superfície; nenhum pigmento solúvel.

Glicerol - Agar de Asparagina - Crescimento pobre a moderado, creme (2ca), com pontos cor de rosa a vermelho (6ea, 6 1/2 ga); micélio aéreo nenhum a escasso, branco; reverso incolor a creme (2ca), com pontos vermelhos; nenhum pigmento solúvel.

Czapek - Agar de Sacarose - Crescimento pobre a moderado, creme (2ca), com pontos cor de rosa a vermelho (5ea, 6 1/2 ia); micélio aéreo nenhum a escasso, branco; incolor a creme (2ca); nenhum pigmento solúvel.

Glicose - Agar de Asparagina - Crescimento moderado a bom, cor



de rosa a vermelho (6 1/2 ga, 6 1/2 na), elevado; liso, granular a enrugado; micélio aéreo branco a cor de rosa pálido (6ea) reverso vermelho (6 1/2 ga, 6 1/2 ia); pigmento solúvel amarelado pálido (3ca).

Agar Tirosina de Gordon e Smith - Crescimento moderado a bom, cor de rosa - laranja (5ea), moderadamente elevado, enrugado; micélio aéreo nenhum a escasso, branco; reverso o mesmo que a superfície; pigmento solúvel amarelado (21c).

Agar de Malato de Cálcio - Crescimento escasso, incolor, fino, suave, nenhum micélio aéreo; reverso incolor; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Caseína - Crescimento moderado a bom, cor de rosa - laranja a laranja (4ia, 5ia), moderadamente elevado, enrugado, nenhum micélio aéreo; reverso amarelado a cor de rosa pálido (3ga, 5ea); com pigmento castanho solúvel (31c).

Agar de Bennett - Bom crescimento, vermelho a vermelho escuro (6 1/2 ne, 6 1/2 ng), elevado, enrugado; micélio aéreo branco a cor de rosa (6ea); reverso vermelho (6 1/2 lc); com pigmento castanho solúvel (3ne).

Agar de Emerson - Crescimento bom a excelente, cor de laranja (5la, 5na), elevado, enrugado, com micélio aéreo branco; reverso cor de laranja (5ic); nenhum pigmento solúvel.



Agar Nutriente - Crescimento moderado, cor de laranja pálido (5ea, 5ga), levemente elevado, suave, ou aparecendo como colônias isoladas, nenhum micélio aéreo; reverso cor de laranja pálido (5ga); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Gelatina - Crescimento moderado a bom, cor de laranja pálido (4ga), moderadamente elevado, suave a enrugado; micélio aéreo escasso, branco; reverso cor de laranja pálido (4ga); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Amido - Crescimento moderado a bom, cor de laranja pálido (5ga), moderadamente elevado, suave a enrugado; micélio aéreo escasso, branco; reverso o mesmo que a superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Batata Cenoura - Crescimento pobre a moderado, creme a cor de rosa pálido (2ca, 4ca), fino a levemente elevado; micélio aéreo escasso, branco; reverso creme a cor de rosa pálido (4ca); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Água da Torneira - Crescimento pobre, incolor a creme (1 1/2ca), fino, suave; micélio aéreo escasso, branco; reverso o mesmo que a superfície; nenhum pigmento solúvel.

Meio Mineral 1 de Gauze - Crescimento moderado, cor de rosa a vermelho (5ca, 6ea), com pontos vermelhos (6 lc), levemente elevado, suave; micélio aéreo nenhum a escasso, branco; reverso o mesmo que a superfície; nenhum pigmento solúvel.



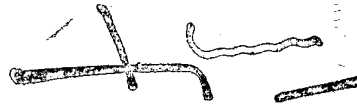
Meio Orgânico 2 de Gauze - Crescimento moderado a bom, cor de rosa - cor de laranja (5ga), moderadamente elevado, levemente enrugado; micélio aéreo escasso, branco; reverso o mesmo que a superfície; nenhum pigmento solúvel.

Propriedades Morfológicas - Após sete semanas de incubação, nenhuns esporos foram encontrados em qualquer dos meios usados. No agar de batata cenoura, no entanto, produziram-se inchaços hifais lateralmente ou intercalarmemente; e eram simples e suas. Eles foram globosos, ovais a elípticos, e mediam 1,2 - 2,5 m de diâmetro ou 1,2 - 2,2 x 0,9 - 1,8 m. As estruturas análogas foram também observadas no agar de extracto de fermento - - extracto de malte, agar de comida de gato, agar de água da torneira, agar de gelatina, agar de Czapek-sacarose, e meio mineral 1 de Gauze.

Propriedades Bioquímicas - Melanina não produzida; ácido sulfídrico não produzido; gelatina liquefeita; amido não hidrolizado; nitrato reduzido a nitrito; crescimento ligeiro em caldo de celulose de Jensen mas nenhum crescimento em caldo de celulose de Levine e Schoenlein; nenhuma desintegração em ambos os caldos de celulose; coagulação e peptonização no leite; digestão negativa do cálcio malago; digestão positiva da tirosina; digestão positiva da caseína.

Utilização do carboidrato: glicose, ramnose e sacarose utilizada; arabinose, fructose, inositol, manitol, rafinose, exilose não utilizados.

Os testes positivos incluem: utilização de acetato, propionato e piruvato; produção de ácido a partir de glicose, ramnose, maltose e trehalose.



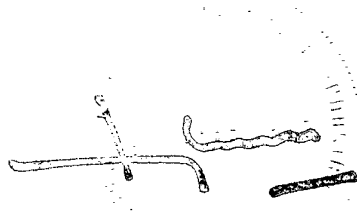
Os testes seguintes foram negativos; decomposição de adenina, xantina, hipoxantina, e ureia; hidrólise de esculina e hipurato; resistência a lisozima; utilização de benzoato, citrato, dextrina, lactato, malato, mucato, oxalato, fenol e succinato; produção de ácido a partir de arabinose, fructose, inositol, manitol, rafinose, sacarose, xilose, adonitol, celobiose, dulcitol, eritritol, galactose, glicerol, lactose, manose, melezitose, malibiose, alfa-metil-D-glucosida, ribose, salicina, sorbitol, sorbose, e amido.

Análise da célula global - os hidrolisatos da célula global contêm ácido mesodiaminopimérico, galactose, glicose, madurose, ribose e ramnose.

Relações de Temperatura -

<u>21°C</u>	<u>28°C</u>	<u>37°C</u>	<u>45°C</u>
Crescimento Moderado	Bom Crescimento	Crescimento Moderado	Nenhum Crescimento

A cultura FD-27684 é caracterizada pela incapacidade para produzir melanina; o substracto micélio cor de rosa, cor de rosa-cor de laranja, cor de laranja a vermelho; e a presença de ácido meso-diamino pimérico e madurose como componentes da célula global. A despeito do longo periodo de incubação de até sete semanas, a cultura falhou em produzir esporos embora se tivessem produzidos inchaços linfais nalguns meios. É atribuível ao genus Actinomadura.



A cultura FD-27684 era análoga a Actinomyadura roseorufa Huang ATCC 39697 (ver Aplicação da Patente Europeia 169001) na maioria das características culturais e em quase todas as propriedades bioquímicas. No agar gelatina e no agar amido, as colônias de FD-27684 eram cor de laranja pálido em vez de creme pálido. Em agar tirosina e agar Emerson elas apresentaram alguma cor de laranja em vez de castanho. A cultura FD-27684, não como a A. roseorufa, coagulou o leite. Estas diferenças eram menores e por isso a cultura FD-27684 é considerada como uma nova estirpe de A. roseorufa.

Comparada com a cultura paterna FD-27684, o mutante FD-28474 produziu menos micélio aéreo no agar do extracto do fermento - extracto do malte, agar de Bennett, meio orgânico 2 de Gauze, agar de gelatina e agar de amido. As colônias do mutante eram cremes em vez de cor de laranja no agar de Emerson e eram cor de rosa pálido em vez de creme a cor de rosa pálido no agar de batata cenoura. O mutante, não como o seu paterno, produziu ácido sulfídrico. Todas as outras características culturais e propriedades bioquímicas eram idênticas. Assim, o mutante FD-28474 é considerado como uma nova estirpe de Actinomyadura roseorufa.

Comparada com a cultura FD-28474 a partir da qual derivou, o mutante FD-28499 partilhou quase todas as características culturais e todas as propriedades bioquímicas. O mutante diferiu da cultura FD-28474 sómente nas colônias castanho escuro em vez de vermelho escuro sobre o agar de extracto de fermento-extracto de malte na presença de alguns pontos cor de rosa no meio orgânico 2 de Gauze. Assim, o mutante FD-28499 é considerado como uma nova estirpe de Actinomyadura roseorufa.



FD-28454 não foi submetida a estudo taxonômico. No entanto, uma vez que era derivado de uma estirpe de Actinomadura roseorufa, e por mutação produziu uma estirpe de Actinomadura roseorufa, é considerado ser uma estirpe de Actinomadura roseorufa.

O antibiotico UK-61689 exhibe acção inibidora contra o crescimento de um numero de microorganismos de Gram positivo. Na Tabela I, a seguir, resumem-se os resultados dos testes in vitro. Para este teste cada organismo é inoculado numa série de tubos de ensaio contendo meio nutriente e concentrações variáveis de Antibiótico UK-61689 para determinar a concentração minima do composto em g/ml a qual inibe o crescimento do organismo durante um periodo de 24 horas (MIC).

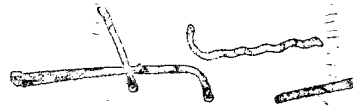


Tabela I

Atividade Antibacteriana

<u>Organismo</u>	<u>Estirpe N^o.</u>	<u>MIC µg/ml</u>
Clostridium perfringens	10A006	50
	10A009	12,5
Actinomyces pyogenes	14D002	50
	14D008	50
	14D011	50
Treponema Hyodysenteriae	94A001	3,12
	94A002	3,12
	94A007	1,56
	94A008	1,56

Os dados de eficacia para UK-61689 e seus sais contra infecções coccidiais em galinhas foram obtidos na maneira seguinte. Grupos de 3-5 com dez dias de idade, de pintainhos de frangos leghorn brancos sem patogênio foram alimentados com uma dieta esmagada contendo UK-61689 ou seu sal de sódio e/ou potássio nele uniformemente disperso. Após passar 24 horas com esta ração, cada pintainho foi inoculado per os com oocistos das espécies particulares Eimeria a serem testados. Outros grupos de 3-5 pintainhos com dez dias de idade foram alimentados com uma dieta esmagada análoga sem Anti-biótico UK-61689 ou seus sais. Eles foram também infectados



após 24 horas e serviram como controlos infectados. Ainda outro grupo de 3-5 pintainhõs com dez dias de idade foram alimentados com a mesma dieta esmagada sem antibiótico UK-61689 e não foram infectados com coccidia. Estes serviram como controlos normais. Os resultados do tratamento foram avaliados após cinco dias no caso de E. acervulina, e seis dias para todos os outros desafios.

O critério usado para medir a actividade anticoccidial consiste de lesões marcadas ou pontuadas de 0 a 4 para E. tenella a partir de J.E. Lynch, "A new Method for the Primary Evaluation of Anticoccidial Activity", Am. J. vet. Res., 22, 324-326, 1961; e 0 a 3 para as outras espécies baseadas na modificação do sistema de pontuação inventado por J. Johnson and W.H. Reid, "Anticoccidial Drugs: Lesion Scoring Techniques in Battery and Floor Pen Experiments in chicks", Exp. Parasit., 28, 30-36, 1970. Foi estabelecido uma relação constante por divisão da pontuação da lesão de cada grupo tratado pela pontuação da lesão do control infectado.

UK-61689 e os seus sais catiónicos exibem excelente actividade contra infecções coccidiais na criação. Quando incorporados na dieta das galinhas a níveis de 15 a 120 ppm, estes compostos são eficazes no controlo de infecções devidas a Eimeria tenella, E. maxima, E. acervulina, E. brunetti e E. necatrix.

Para uso no tratamento de coccidiosis nos galináceos, o composto deste invento é administrado oralmente num suporte apropriado. Convenientemente, a medicação é simplesmente realizada na água de beber ou na ração dos galináceos, de tal modo que uma dosagem terapêutica do agente é ingerida com a água diária ou ração dos galináceos. O agente pode ser directamente medido em água de beber, preferivel-

mente na forma de um concentrado liquido solúvel em água (tal como solução aquosa de um sal soluvel em água) ou adicionado directamente à ração, tal qual, ou na forma de um premix ou concentrado. Um premix ou concentrado de agente terapeutico num suporte é vulgarmente empregado para a inclusão do agente na ração. Suportes apropriados são liquidos ou sólidos, como desejado, tal como água, e várias farinhas; por exemplo, farinha de óleo de soja, farinha de óleo de linhaça, farinha de espiga de milho, e misturas minerais tal como são vulgarmente empregadas nas rações para os galináceos. Um suporte particularmente eficaz é a própria ração dos frangos; isto é, uma pequena porção da ração. Além disso, o micélio pode ser usado como suporte. O suporte facilita a distribuição uniforme dos materiais activos na ração acabada com a qual o premix é misturado. Isto é importante porque sómente são necessárias pequenas porções dos presentes potentes agentes. É importante que os compostos sejam vigorosamente misturados no premix e, subsequentemente, a ração. A este respeito, pode ser disperso ou dissolvido num veiculo oleoso apropriado tal como óleo de soja, óleo de milho, óleo de semente de algodão, e analogos, ou num solvente orgânico volátil e a seguir misturado com o suporte. Será apreciado que as proporções de material activo no concentrado são capazes de uma ampla variação uma vez que a quantidade de agente na ração acabada pode ser ajustada por mistura da proporção apropriada de premix com a ração para obter o nivel desejado de agente terapêutico.

Concentrados de alta potência podem ser misturados pelo fabricante das rações com suporte proteínáceo tal como farinha de óleo de soja e outras farinhas, como acima descrito, para produzir suplementos concentrados os quais são proprios para alimentação directa aos galináceos. Em tais casos, permite-se que a criação consuma a dieta usual. Alternativamente, tais suplementos concentrados podem ser adicio-



nados directamente à ração dos galináceos para produzir uma ração acabada, nutricionalmente balanceada, contendo um nível terapêuticamente efectivo do composto deste invento. As misturas são vigorosamente combinadas pelos processos padrão, tal como num agitador de casca dupla, para assegurar homogeneidade.

Será, claro está, óbvio para os especialistas da arte que os níveis usados do composto aqui descrito variam sob circunstâncias diferentes. A medicação continua de baixo nível, durante o período de crescimento, isto é, durante as primeiras 6 a 12 semanas para os frangos, é uma medida profiláctica efectiva. No tratamento de infecções estabelecidas, podem ser necessários níveis superiores para ultrapassar a infecção. O nível usado na ração estará geralmente na gama de 15 a 120 ppm. Quando administrado na água de beber, o nível que será fornecido para a mesma dose diária de medicação, i.e., 15 a 120 ppm, factorizado pela relação ponderal do consumo diário medio para o consumo diário médio de água.

O presente invento é ilustrado pelos exemplos seguintes. No entanto, deverá compreender-se que o invento não está limitado aos detalhes específicos destes exemplos.



EXEMPLO 1

A - Preparação de Inoculum

Preparamos um meio aquoso estéril tendo a composição seguinte.

<u>Ingrediente</u>	<u>Gramas/litro</u>
Cerelose	10,0
Amido de milho	5,0
Licor de infusão de milho	5,0
NZ Amina YTT*	5,0
Cloreto de cobalto	0,002

* (Marca registrada para a digestão enzimática da caseína, Humko Sheffield Chemical Co. Inc.)

Após o pH ter sido ajustado a 7,0, o meio foi distribuído (800 ml) em frascos Fernbach de 2800 ml, tamponados com algodão/tapados com papel e esterilizados por autoclave durante 60 minutos a 121°C (15 p.s.i.). Após arrefecimento, o meio foi inoculado com uma suspensão celular vegetativa a partir de um plano inclinado de FD-28454 (ATCC 53674). Os frascos foram agitados a 28°C num agitador rotativo tendo um deslocamento de 1 1/2 a 2 1/2 polegadas e 150 a 200 ciclos

por minuto durante 6 dias.

b - Fermentação e Isolamento de UK-61689

Um frasco Fernbach contendo 800 ml da cultura de crescimento foi usado para inocular um vaso de 14 litros de fermentação contendo 8 litros de meio estéril da composição seguinte ao qual juntamos 4 ml de agente silicone anti-espuma:

<u>Ingrediente</u>	<u>Gramas/litro</u>
Cerelese	45,0
Farinha de soja	10,0
Licor de Infusão de milho	15,0
Farinha de sangue	5,0
Farinha de milho	5,0
MnSO ₄ .H ₂ O	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
COCl ₂ .6H ₂ O	0,002
Carbonato de cálcio	3,0
pH ajustado a 6,9 - 7,0	

A fermentação foi efectuada a 30°C com agitação a 500 revoluções por minuto e aeração a 0,75 volumes de ar por volume de caldo por minuto e até se produzir activi-

dade substancial. O UK-61689/UK-58852 no caldo e fluxos de recuperação foi visualizado usando lamelas de cromatografia de camada fina de sílica gel desenvolvidas com um sistema formado por 9:1 clorofórmio: metanol. As lamelas foram atomizadas com reagente vanilina (6 g de vanilina em 100 ml de etanol e 3% de H_2SO_4 concentrado) e aquecidas a $100^{\circ}C$ durante 5 minutos. UK-61689 aparece como uma mancha vermelho-azulada. Alternativamente, a lamela foi sobreposta com agar semeado com B. subtilis à qual juntamos 0,4 ml de uma solução a 5% de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio, e incubamos a $37^{\circ}C$, durante 16 horas para visualizar o antibiótico como uma área incolor contra um fundo vermelho.

Todo o caldo é a seguir extraído com metilisobutil cetona e o solvente concentrado para obtermos 14,4 g de residuo. Este material foi cromatografado numa coluna de enchimento de 6 x 100 cm com sílica gel G de grau de coluna (70-230 mesh, woelm) em acetato de etil. A coluna foi desenvolvida com acetato de etil a um caudal de ~ 20 ml/min.. Tomamos fracções de 10 ml cada.

As fracções foram examinadas por cromatografia de camada fina sobre lamelas de sílica gel GF Analytech desenvolvidas com 9 $CHCl_3$:1 MeOH e visualizadas por atomização com reagente vanilina e aquecimento

Juntamos as fracções contendo o antibiótico UK-61689 (volume total aproximadamente 200 ml) e agitamos com ~ 2 g de Darco G60 durante 15 minutos. Após remoção do carbono por filtração, o filtrado (acetato de etil) foi lavado com fosfato de sódio dibásico, 5% de tampão ajustado a pH 10,0 com NaOH 1N. Após separação, a camada de acetato de etil foi seca sobre sulfato de sódio anidro e a seguir evapo-



rada sob vácuo. O óleo viscoso que resta após evaporação foi dissolvido num pequeno volume de heptano após o que ocorreu a cristalização. Os cristais foram recolhidos por filtração e secos sob vácuo originando 1,4 g de antibiótico UK-61689 como o sal de sódio; m.p. 167°C; C^{13} NMR ($CDCl_3$) em ppm:

179.16, 107.54, 103.21, 97.80, 97.01, 87.02, 84.65, 84.28, 82.39, 82.10, 80.92, 80.28, 79.96, 77.62, 77.11, 76.60, 74.91, 74.65, 73.15, 70.19, 67.74, 66.94, 59.07, 56.84, 45.49, 39.92, 39.00, 36.55, 33.88, 33.79, 33.63, 33.51, 33.21, 32.51, 32.33, 30.63, 27.64, 26.98, 26.91, 26.16, 23.25, 18.43, 17.53, 17.00, 12.13, 11.05, 10.47,

As fracções contendo UK-58852 juntaram-se, trataram-se com ~2g de Darco G60 como acima, e a seguir concentramos. O residuo é suspenso em hexano e tratado descontinuamente com silica gel num funil filtro. O absorvente é lavado com hexano, e a seguir eluido com clorofórmio e acetato de etil. A fracção acetato de etil é concentrada, o residuo cromatografado sobre silica e o produto cristalizado a partir de heptano para obtermos o antibiótico UK-58852, como um sólido branco.

EXEMPLO 2

Seguimos o procedimento do Exemplo 1 mas usando FD-28499 (ATCC 53664) em lugar de FD-28454 (ATCC 53674). HPLC do extracto de metil isobutil cetona do caldo global originou UK-61689 substancialmente livre (<1%) de UK-58852. O seu comportamento TLC foi idêntico ao assinalado no Exemplo



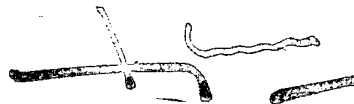
1 para UK-61689.

A forma ácida de UK-61689 é preparada por agitação de uma solução de clorofórmio do sal de sódio com um volume igual de água e baixando o pH a 3,0 com ácido fosfórico. As fases foram a seguir separadas e o clorofórmio evaporado sob vácuo para obtermos o Antibiótico UK-61689 como o ácido livre.

EXEMPLO 3

FD-28474 (ATCC 53665) foi fermentado de acordo com o processo do Exemplo 1 excepto que o meio de fermentação não continha infusão de licor de milho ou farinha de sangue. Juntamos o conjunto dos caldos de quatro de tais fermentações e filtramos. O filtrado e o micélio foram cada um extraído com metil isobutil cetona (3 x 200 ml). Juntamos os extractos e concentramos sob pressão reduzida num óleo (18,5 g). O óleo foi processado em acetona (200 ml) e a solução dividida em dois volumes iguais (I e II).

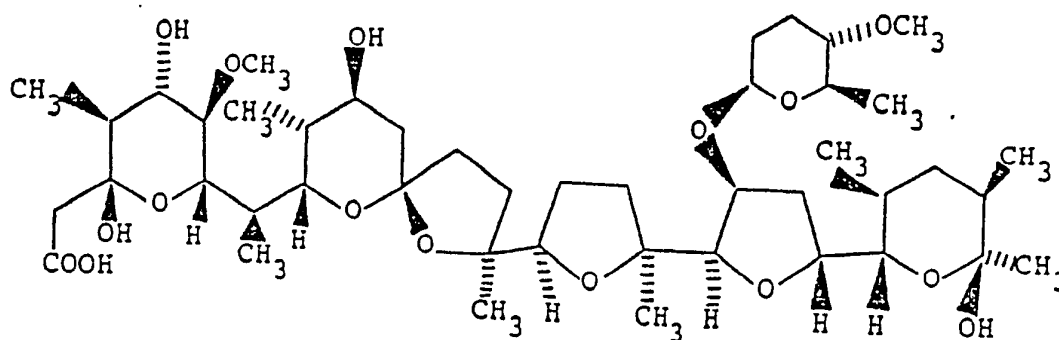
O pH do volume I foi ajustado a 12 por adição de hidróxido de sódio aquoso (20%). A solução alcalina foi a seguir filtrada e concentrada num óleo sob pressão reduzida. Juntamos acetona (10 ml), heptano (79 ml) e água (39 ml) ao óleo para obtermos cristais castanho escuros. O repalpamento dos cristais em heptano originou cristais castanho claro (2g) compreendendo 75% de UK-61689 e 5% de UK-58852 por ensaio HPLC.



O volume 2 foi concentrado num óleo sob pressão reduzida e o óleo dissolvido em acetato de etil (100 ml). Foi a seguir submetido a cromatografia de coluna sobre sílica gel (500 g) usando acetato de etil como agente eluente. Juntamos as fracções ricas em UK-61689 e concentramos num óleo. O óleo foi processado em acetona (10 ml)-heptano (110 ml) e os cristais resultantes de UK-61689 filtrados e secos (1,2g). O UK-58852 não foi recuperado.

REIVINDICAÇÕES

1ª.- Processo para a produção do composto UK-61,689 tendo a fórmula (I)



(I)

caracterizado por compreender a fermentação de Actinomadura roseorufa tendo as características identificadoras de ATCC 53665; ATCC 53674 ou de ATCC 53664 num meio nutriente aquoso contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos, sob condições de fermentação aeróbica submersa até se acumular numa quantidade substancial do referido composto no caldo total.



2ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se recuperar o referido composto.

3ª.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o composto de formula (I) ser recuperado, a partir do caldo de fermentação, em associação com micélio.

4ª.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por compreender a cultura de Actinomadura roseorufa ATCC 53665 ou ATCC 53674.

5ª.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por compreender a cultura de Actinomadura roseorufa ATCC 53664.

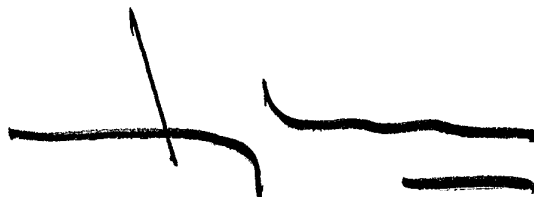
6ª.- Processo para a produção de uma composição anticoccidica caracterizado por compreender a recuperação de UK-61689 em associação com micélio produzido num processo de acordo com a reivindicação 1.

7ª.- Processo para a produção de uma nova estirpe pertencente ao genero Actinomadura, caracteri

zado por a referida estirpe ser obtida por mutação de Actino-
madura roseorufa ATCC 53666, cuja estirpe quando fermentada
num meio nutriente aquoso compreendendo uma fonte disponível
de carbono, azoto, e sais inorgânicos sob condições aerobicas,
produz UK-61689.

8ª.- Processo para a produção de
uma nova estirpe pertencente ao género Actinomadura caracteri-
zado por a referida estirpe ser obtida por mutação de Actino-
madura roseorufa ATCC 53665, cuja estirpe quando fermentada
num meio nutriente aquoso compreendendo uma fonte disponível
de carbono, azoto e sais inorgânicos sob condições aeróbicas,
produz UK-61689, substancialmente livre de UK-58852.

Lisboa, 24 de Outubro de 1988



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