

(11) *Número de Publicação:* PT 89631 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12P001/06 A C07G011/00 B
A61K035/66 B C12P001/06 B
C12P001/465 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.02.03

(30) *Prioridade:* 1988.02.05 DE 3803383

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.10.04

(45) *Data e BPI da concessão:*
07/93 1993.07.26

(73) *Titular(es):*

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
BRUNINGSTRASSE, 64 D-6230 FRANKFURT/MAIN 80
DE

(72) *Inventor(es):*

CHRISTOPHER MILTON MATHEW FRANCO IN
SUGATA CHATTERJEE IN
BIMAL NARESH GANGULI IN
RICHARD HELMUT RUPP DE
ERRA KOTESWARA SATYA VIJAKUMAR IN

(74) *Mandatário(s):*

JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA
RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CAMUNOCINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A
CONTÊM

(57) *Resumo:*

Descrição referente à patente de invenção de HOSCHST AKTIENGESellschaft, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Christopher Milton Mathew Franco, Sugata Chatterjee, Dr. Erra Koteswara Satya Vijaya Kumar, Dr. Bimal Naresh Ganguli, residentes na Índia e Dr. Richard Helmut Rupp, residente na Alemanha Ocidental), para, "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CAMUNOCINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A CONTÊM".

Descrição

A presente invenção refere-se a um novo antibiótico designado por camunocina e a um processo para a sua preparação a partir de Streptomyces species Y-84, 36210 (depositado na Deutschen Sammlung für Mikroorganismen em 23.12.1987 sob o Nº. DSM 4329) ou dos seus variantes ou mutantes bem como à utilização de camunocina como medicamento.

A estirpe Str. sp. Y-84, 36210 foi isolada a partir de uma amostra de solo recolhida em Pune, Maharashtra, Índia. É possível obter variantes e mutantes da cultura nº. HIL Y-84, 36210 de modo conhecido por utilização de um agente mutagénico como por exemplo a

N-metil-N'-nitrosoguanidina ou a luz ultravioleta. O microorganismo Str. sp. Y-84, 36210 pertence à ordem dos Actinomycetales, família dos Streptomycetaceae e género dos Streptomyces.

A estirpe Str. sp. Y-84, 36210 é considerada uma nova estirpe, uma vez que se diferencia por algumas das suas propriedades morfológicas, de cultura e fisiológicas das estirpes conhecidas, conforme se pode verificar através da presente memória descritiva. Uma outra razão para considerar esta uma nova estirpe baseia-se em que esta estirpe produz um novo complexo antibiótico. Em seguida caracterizado na presente memória descritiva e que é designado por camunocina, no que constitui o objectivo da presente invenção.

Conforme resulta evidente da descrição em pormenor da presente invenção apresentada em seguida, a camunocina é um antibiótico peptídico, diferente no entanto de todos os antibióticos peptídicos conhecidos, como a actinomicina, a viridogriseína, a valinomicina, a quinomicina, a ciclosporina, a polimixina ou a anfomicina. Ao contrário dos outros antibióticos peptídicos, ou contendo peptídeos conhecidos, a camunocina necessita de uma concentração de iões cálcio de pelo menos 10 mM a fim de exercer uma acção antibacteriana. Neste aspecto diferencia-se nitidamente de outros antibióticos conhecidos como anfomicina, glumamicina, zaomicina e do complexo A 21978 C, o qual, com 1,0 mM, apresenta uma necessidade de iões cálcio mais reduzida para apresentar a sua acção antibiótica. A anfomicina, a glumamicina e a zaomicina pertencem à classe dos antibióticos lipopeptídicos cíclicos, que são apresentados no "CRC - Handbook of Antibiotic compounds", Volume IV, Parte 1, pág. 313-327, Janos Berdy (editor), CRC Press, Boca Raton, Florida (1981). Em J. Antibiotics 40, 761-777 (1987) descreve-se um complexo C 21978 que é igualmente um antibiótico lipopeptídico cíclico.

~~SECRET~~

O objectivo da presente invenção é um processo para a preparação do novo complexo antibiótico camunocina, sendo este processo caracterizado por se cultivar a espécie Str. sp. Y-84, 36210 ou um seu variante ou mutante sob condições aeróbicas a uma temperatura de preferência entre cerca de 18 e 37°C num meio nutriente aquoso que contém fontes de carbono e de azoto e substâncias minerais a um pH de preferência entre cerca de 6 e cerca de 9 e por se separar o complexo antibiótico do caldo de cultura.

O novo antibiótico da presente invenção é activo in vitro contra um espectro de microorganismos Gram-positivos mas apenas na presença de iões cálcio. É igualmente activo como substância imunomoduladora e pode por consequência ser utilizado em medicina humana.

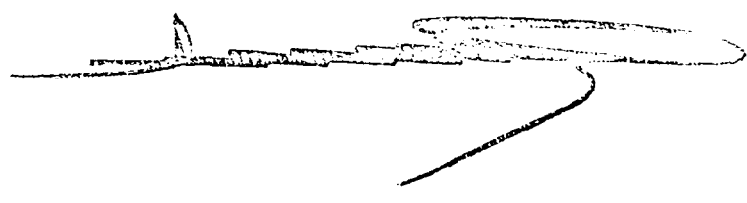
É igualmente um objectivo da presente invenção um processo para o isolamento da espécie Str. sp. Y-84, 36210 a partir do solo utilizando de modo conhecido uma solução nutriente de preferência com um pH entre cerca de 6,5 e cerca de 8,5.

A solução nutriente utilizada para o isolamento dos microorganismos a partir do solo é constituída por fontes de carbono e de azoto, sais nutrientes inorgânicos e agentes de solidificação. As fontes de carbono utilizadas podem ser de preferência por exemplo glucose, amido, dextrina, glicerina, sacarose ou melaços. São fontes de azoto preferidas peptona, extracto de leve dura, extracto de carne de bovino, extracto de malte, caseína ou ácidos aminados, como por exemplo arginina ou asparagina. O agente de solidificação utilizado pode ser por exemplo agar. Os sais nutrientes inorgânicos podem ser sais de sódio, de potássio, de magnésio ou de cálcio de ácido fosfórico ou sulfúrico.

~~CONFIDENTIAL~~

Os microorganismos da presente invenção emitem prolongamentos de micélio aéreo incolor a partir do micélio ramificado que se desenvolve no substrato. No micélio aéreo formam-se cadeias de esporos de forma espiral. As espirais são evidentemente espirais breves, sendo as de esporos representativas do sector RA igualmente frequentes. Não se observa a formação de tufo nem de ascósporos. As cadeias de esporos maduras apresentam 30 a 50 esporos por cadeia. As propriedades do microorganismo em cultura em diferentes meios de agar descrevem-se como se segue (ver Oxoid-Handbook, 1972, 2ª edição, publicada por Oxoid Limited, Londres, Inglaterra, ou Difco Manual, 9ª edição, 1977, publicada por Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA):

1. Agar de extracto de levedura - extracto de malte
Crescimento : bom, aspecto enrugado, seco
Micélio aéreo : bom, pulvulento, cinzento azulado claro
Reverso : negro-púrpura
Pigmento solúvel : castanho-púrpura
2. Agar de farinha de aveia
Crescimento : abundante, aspecto liso, seco
Micélio aéreo : abundante, pulvulento, cinzento claro
Reverso : castanho escuro-púrpura
Pigmento solúvel : castanho-púrpura
3. Agar de sais inorgânicos - amido
Crescimento : abundante, elevado, seco
Micélio aéreo : bom, pulvulento, castanho azulado claro
Reverso : negro-violeta escuro
Pigmento solúvel : cor de malva claro

- 
4. Agar de glicerina - asparagina
Crescimento : bom, elevado, seco
Micélio aéreo : bom, pulverolento, cor de rosa cinzento
5. Agar de peptona - extracto de levedura - ferro
Crescimento : bom, elevado, húmido
Micélio aéreo : ausente
Reverso : amarelo claro
Pigmento solúvel : castanho claro
6. Agar de tirosina
Crescimento : abundante, aspecto enrugado, seco
Micélio aéreo : abundante, pulverolento, cinzento acastanhado claro
Reverso : negro-violeta escuro
Pigmento solúvel : castanho violetaclaro
7. Agar de sacarose - nitrato
Crescimento : abundante, aspecto liso, seco
Micélio aéreo : bom, pulverolento, castanho azulado claro
Reverso : amarelo claro
Pigmento solúvel : violeta claro
8. Agar de peptona - extracto de carne de bovino
(agar nutriente)
Crescimento : maciço, elevado, seco
Micélio aéreo : fraco, pulverolento, cinzento escuro
Reverso : cor de rosa cinzento
Pigmento solúvel : —

O pigmento solúvel é um indicador do valor do pH: tona-se vermelho rosado em meio ácido e violeta azulado em meio alcalino.

A gama de temperaturas de crescimento óptimas para o microorganismo da presente invenção situa-se entre cerca de 25 e 35°C. O microorganismo fluidifica a gelatina em meio de gelatina de glucose-peptona, hidrolisa o amido em agar de sais inorgânicos-amido e provoca a coagulação de leite magro. A espécie Str. sp. Y-84, 36210 cresce bem em solução de agar de Czapck (ver Manual Oxoid).

Apenas se nota a formação muito fraca de pigmento escuro em agar de tirosina, não ocorrendo qualquer formação de pigmento em caldo de peptona, extrato de levedura, agar de ferro ou triptona-extracto de levedura.

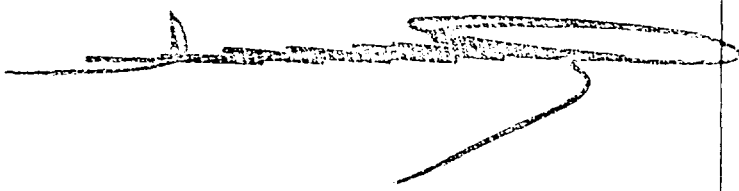
O esquema de assimilação das fontes de carbono deste microorganismo é o seguinte (em meio Pridham-Gottlieb):

Positivo : D-glucose, L-arabinose, D-xilose, I-inositose,
D-manitol, D-frutose, ramnose, galactose, maltose,
celobiose, glutamato de sódio, manose e lactose.

Duvidoso : sacarose e salicina

Negativo : rafinose, celulose, dulcete

A espécie Str. sp. Y-84, 36210 é inibida pela estreptomicina em concentrações superiores a 1,6 µg/ml, suporta concentrações de NaCl de cerca de 7 a 10 % e tem uma gama de tolerância de pH de cerca de 5,5 a 9,0.



Os dados descritos para as propriedades de crescimento e para as propriedades fisiológicas dos microorganismos conhecidos apresentam diferenças nítidas em comparação com o microorganismo da presente invenção.

A espécie Str. sp. Y-84, 36210 dá origem por fermentação ao novo complexo antibiótico camunocina.

A partir das observações referidas é possível classificar o microorganismo da presente invenção como uma nova espécie de Streptomyces.

É evidente para o especialista na matéria que a presente invenção não se encontra limitada ao organismo particular anteriormente definido, incluindo todos os mutantes e variantes derivados do microorganismo referido por via espontânea ou artificialmente que possuem a capacidade de produzir o novo complexo antibiótico camunocina.

É ainda um objectivo da presente invenção um processo para a preparação da camunocina caracterizado por se cultivar a espécie Str. sp. Y-84, 36210 por fermentação de preferência a um valor de pH entre cerca de 6,0 e 9,0 e de preferência a uma temperatura entre cerca de 18 e 37°C sob condições aeróbicas num meio nutriente que contém fontes de carbono e de azoto, sais nutrientes inorgânicos e elementos vestigiais e por se isolar o composto do caldo de cultura de modo conhecido conforme descrito na presente memória descritiva.

Como fontes de carbono para o meio nutriente para a preparação dos novos antibióticos usam-se de preferência por exemplo glucose, amido, dextrina, glicerina, sacarose, melaços ou óleos. As fontes de

azoto apropriadas preferidas no meio nutriente para a preparação dos novos antibióticos são farinha de sementes de soja, extracto de levedura, extracto de carne de bovino, extracto de malte, água de maceração de milho, peptona ou caseína. Para a utilização num meio nutriente para a preparação dos novos antibióticos podem referir-se sais nutrientes inorgânicos / sais minerais, de preferência cloreto de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de amónio ou carbonato de cálcio. Os elementos vestigiais preferidos são o ferro, manganês, cobre, zinco ou cobalto.

Numa forma de concretização preferida da presente invenção cultiva-se a espécie Str. sp. Y-84, 3621C a cerca de 26 a 28°C e a um pH de cerca de 6,4 a 6,6. Após cerca de 40 a 45 horas de duração da fermentação obtêm-se o máximo rendimento no composto pretendido. A fermentação efectuada é de preferência uma fermentação submersa. O decurso da fermentação e a formação do novo complexo antibiótico podem ser seguidos por determinação da actividade antibacteriana do meio de cultura e do micélio contra o Staphylococcus aureus 290 p em meio de agar contendo cloreto de cálcio 30 mM.

Eventualmente é possível adicionar ao meio de cultura durante a fermentação um anti-espumante como por exemplo Desmophen^(R) (polióis da sociedade Bayer AG, Leverkusen).

A camunocina pode ser obtida a partir do caldo de cultura por exemplo por absorção directa num agente de adsorção apropriado ou por extracção por solventes seguida de adsorção. Os solventes preferidos são, por exemplo, misturas de acetato de etilo ou de clorofórmio com n-propanol; é especialmente preferida uma mistura de acetato de etilo/n-propanol (2:1). É por exemplo possível tratar o filtrado da cultura ou o extracto em solvente do filtrado da cultura contendo o composto da presente invenção por adsorção em carvão activo, em agentes de

adsorção poliméricos como por exemplo Diaion^(R) HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries, Japão) ou Amberlite^(R) XAD (agente de adsorção polimérico constituído por uma matriz de poliestireno, acrilato ou óxido de amina com uma dimensão de diâmetro dos poros de $40 \text{ a } 225 \times 10^{-10} \text{ m}$, Rohm & Haas Co., EUA). O extracto num solvente é de preferência concentrado para eliminação do solvente e em seguida submetido a cromatografia numa substância adsorvente. O composto da presente invenção pode ser eluído do adsorvente utilizando fases móveis adequadas, como por exemplo clorofórmio, metanol ou acetona ou ainda por utilização de misturas destes solventes sequencialmente ou com água e os eluídos podem em seguida ser evaporados à secura. O eluente usado de preferência é o metanol.

A camunocina pode também ser isolada a partir do filtrado da cultura por cromatografia de permuta iónica. São resinas apropriadas, por exemplo, resinas permutadoras de aniões fracamente básicas do tipo de poliestireno, poliamina ou de aminoalcoolpolicrilato reticulado, como por exemplo Dower^(R) (Dow Chemical Company, EUA) ou Amberlite^(R) IRA 68 (Rohm & Haas Co., EUA). O permutador iónico preferido é a Amberlite^(R) IRA 68 (tipo acrílico, funcionalidade de amina terciária). Neste processo o filtrado da cultura é de preferência submetido a uma cromatografia em coluna, utilizando-se para esta operação a resina permutadora de aniões Amberlite^(R) IRA 68 (Cl^-). O composto da presente invenção é em primeiro lugar adsorvido pelo permutador iónico e em seguida é eluído por meio de fases móveis adequadas, como por exemplo soluções de cloreto de sódio ou de cloreto de potássio aquoso ou metanólicas ou soluções diluídas de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio, usando-se de preferência uma solução de NaCl 2 M. Os eluídos activos podem ser purificados e os sais podem ser eliminados por meio do processo de cromatografia de adsorção. Os eluídos activos e isentos de sais assim obtidos são seleccionados.

nados e concentrados.

Os eluídos concentrados contendo camunocina referidos anteriormente podem ser purificados de diferentes modos. Por exemplo podem combinar-se para purificação mais completa técnicas de readsorção e eluição com carvão activo ou com adsorventes poliméricos, como por exemplo Amberleite^(R) XAD-4 (constituída por uma matriz de poliestireno com uma dimensão de diâmetro dos poros de 40×10^{-10} m) e 7 (constituída por uma matriz de acrilato com uma dimensão de diâmetro dos poros de 90×10^{-10} m, Rohm & Haas Co., EUA) ou Diaison^(R) HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries, Japão), filtração em gel com material de filtração em gel hipófilo, como por exemplo Sephadex^(R) LH-20 e géis da série G (Pharmacia Fine Chemicals AB, Suécia) e produtos semelhantes bem como filtração em gel de permuta iónica com géis com funcionalidade de diaminoetil-(DEAE), como por exemplo géis de DEAE Sephadex^(R) (Pharmacia Fine Chemicals AB, Suécia) e cromatografia de adsorção em óxido de alumínio e gel de sílica. Para o mesmo fim podem também utilizar-se técnicas de cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de média pressão e de alta pressão com adsorventes apropriados, como por exemplo gel de sílica e gel de sílica C_{18} modificado (obtenível por exemplo por reacção de gel de sílica com octadeciltriclorosilano) e agentes apropriados. Para além disso pode usar-se para o mesmo objectivo cromatografia em contra-corrente com um determinado sistema de soluções.

A camunocina é um pó amorfo e incolor solúvel em água, metanol, etanol, propilenoglicol e dimetilsulfóxido. É pouco solúvel ou insolúvel em acetona, diclorometano, acetato de etilo, clorofórmio, hexano e éter de petróleo (40 a 60°). Apresenta reacção negativa no ensaio de coloração com minidrina.

~~CONFIDENTIAL~~

Nos sistemas de cromatografia em ca
mada fina (CCF) seguidamente dados a camunocina apresenta
os seguintes valores:

Placas de CCF : Placas preparadas com gel de sílica,
Artigo nº 5554 de E. Merck, Darmstadt

Rf	EtOAc : MeOH : H ₂ O	Butanol : AcOH : H ₂ O
	4 : 4 : 1	4 : 4 : 1
Camunocina	0,47	0,39

A Figura 2 mostra a cromatografia lí-
quida de alta pressão (HPLC) analítica. A HPLC foi rea-
lizada como se segue:

Enchimento da coluna : Hypersil-ODS^(R) (10 µm, 4 x 120
mm) (material de HPLC com grupos
octadeciltriclorosilano da socie-
dade Shandon, EUA)

Caudal : 0,5 ml/minuto
detecção : a 234 nm
solvente : MeOH: ácido acético aquoso a 1%
(55 : 45)

A camunocina funde a 270°C com decom-
posição.

Os dados espectroscópicos para a ca-
munocina são determinados como se segue:

1. Os máximos de absorção de UV em metanol situam-se a
cerca de 224, 280 e 345 nm - ver Figura 3. Estes
máximos de absorção de UV da camunocina foram determi-
nados numa concentração de 0,2 g por litro. O espec-
tro de absorção foi obtido com um espectrómetro Uvikon
810 na gama de 200 a 800 nm.

2. O espectro de IV (pastilhas de Kbr) foi determinado com um espectrómetro Perkin Elmer P.E. 521 - ver Figura 4.

Os dados espectroscópicos anteriormente referidos e as análises químicas e espectroscópicas referidas no Exemplo VI mostram que a camunocina é um complexo de antibióticos peptídicos aparentados.

Uma característica única da camunocina reside em que só exerce a sua acção antibiótica contra bactérias Gram-positivas na presença de iões cálcio. Outros iões metálicos, como por exemplo sódio, potássio, bário, rubídio e magnésio não apresentam a mesma acção. Em consequência a camunocina foi experimentada num meio de agar contendo pelo menos uma concentração 10 mM de cloreto de cálcio.

No meio de agar referido enriquecido com cálcio a camunocina apresenta in vitro uma actividade contra estirpes sensíveis e resistentes de Staphylococcus aureus e de Streptomyces faecalis bem como contra Bacillus subtilis, Sarcina lutea, Streptococcus pyogenes e Micrococcus lutens. A concentração inibitória mínima (CIM) da camunocina contra diferentes microorganismos foi determinada. Os resultados são apresentados no Quadro 1 seguinte:

QUADRO 1

CIM da camunocina

Meio de ensaio: agar de Müller-Hinton (ver Manual Oxoid)
com adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} .

Organismo de ensaio:	Concentrações de Ca^{2+}				
	0,0mM	2,5mM	10,0mM	30,0mM	60,0mM
S.aureus 209 P	>100,0	25,0	6,3	1,6	<0,1
S.aureus 20464 Mak ^(R)	>100,0	100,0	25,0	1,6	1,6
S.aureus 3066 Met ^(R)	>100,0	50,0	6,3	6,3	0,8
S.aureus R 85, Em ^(R)	>100,0	>100,0	>50,0	25,0	6,3
S.aureus R 85/M, Em ^(R)	>100,0	>100,0	>50,0	2,5	1,6
S.aureus 712 Met ^(R)	>100,0	100,0	6,3	6,3	0,4
S.aureus 789 Met ^(R)	>100,0	100,0	6,3	1,6	0,8
Str.faecalis UD86	>100,0	100,0	25,0	6,3	0,8
Str.faecalis Eder Mak ^(R)	>100,0	100,0	25,0	6,3	1,6
S.aureus MLS 11	>100,0	>100,0	12,5	3,2	1,6
S.aureus MLS 14	>100,0	50,0	25,0	12,5	1,6
S.aureus MLS 16	>100,0	100,0	25,0	25,0	1,6
S.aureus 011UC5	>100,0	100,0	>50,0	12,5	1,6
S.aureus 011GR5	>100,0	100,0	>50,0	>50,0	NT
Str.faecalis 02	>100,0	100,0	25,0	6,3	1,6
Micrococcus luteus	>100,0	3,2	0,8	0,2	<0,1
Sarcina lutea	>100,0	25,0	6,3	1,6	0,8
Bacillus subtilis	>100,0	100,0	6,3	3,2	0,8
E. coli 9632	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0
E. coli 2231	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0
Candida albicans	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0
Aspergillus niger	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0	>100,0

Mak^(R) = resistente a antibióticos macrolidos

Met^(R) = resistente à meticilina

EM^(R) = resistente à eritromicina

Actividade de imunomodulação

A actividade de imunomodulação da camunocina foi verificada como se segue:

Ensaio na placa de hemólise (PFC):

Sensibilizaram-se ratos suíços fêmeas com um peso de 16 a 18 g (6 por grupo) por injeção intraperitoneal de eritrócitos de carneiro (5×10^8 células). Após 5 dias matam-se os ratos por fractura do pescoço, retira-se o baço e conservam-se em solução de Dulbecco gelada. Os esplenócitos são obtidos por desagregação cuidadosa do baço efectuada através de uma rede de arame de malha fina. Determinou-se a viabilidade e ajustou-se a concentração a cerca de 6×10^6 células/ml. Em seguida fizeram-se reagir os esplenócitos com eritrócitos de carneiro na presença de complemento numa câmara de Cunnigham a 37°C numa atmosfera com CO_2 a 5 %. As placas formadas foram contadas após 2 horas.

A camunocina foi injectada por via intraperitoneal ou subcutânea a partir do dia da sensibilização diariamente em dosagens de 5, 10 e 20 mg/Kg ou 10 mg/Kg. A última dose de composto foi administrada no 5º dia uma hora antes da morte dos animais. Os resultados são apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2

Dose mg/Kg, x 5	Via de aplicação	Inibição percentual das PFC
5,0	i.p.	31,20
10,0	i.p.	40,66 $\pm$ 4,67
20,0	i.p.	41,4 $\pm$ 4,89
10,0	s.c.	38,4

Os resultados mostram que a camunoci
na tem uma actividade imunossupressora e por conseguinte
pode ser utilizada como agente imunossupressor, por exem-
plo em transplantações.

As propriedades farmacológicas quali-
ficam os compostos da presente invenção para a sua utiliza-
ção terapêutica. Por conseguinte, constitui também um
objectivo da presente invenção um processo para a prepara-
ção de uma composição farmacêutica dotada de actividade
antibiótica e/ou imunossupressora segundo a qual se incor-
pora como princípio activo camunocina em conjunto com ad-
juvantes e/ou substâncias veiculares conhecidas.

Seguidamente a presente invenção é
elucidada mais completamente por meio de alguns exemplos
que correspondem a formas de concretização preferidas, não
devendo no entanto ser considerado que os exemplos apresen-
tados constituem qualquer limitação ao âmbito da invenção.

Exemplo 1

Isolamento de Streptomyces sp. Y-84, 36210 a partir de um
solo

(a) Preparação do meio de cultura para isolamento

Meio 1 : Glucose	1,0 g
Glicerina	1,0 g
L-arginina	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,3 g
Extrato de levedura	0,2 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	10,0 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1 mg
MnSO ₄ . 7H ₂ O	1 mg
Agar	15,0 g

Água destilada 1 L
pH 6,5

Meio 2 : Glucose 2,0 g
L-asparagina 1,0 g
 K_2HPO_4 0,5 g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g
Extrato de terra 200 ml
Agar 15,0 g
Água destilada 800 ml
pH 8,0

Meio 3 : Amido 10,0 g
Caseína 0,3 g
 KNO_3 2,0 g
NaCl 2,0 g
 K_2HPO_4 2,0 g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05g
 $CaCO_3$ 0,02g
FeSO₄ 0,01g
Agar 15,0 g
Água destilada 1 l
pH 7,2 a 7,5

Os meios foram esterilizados a 121°C durante 30 minutos. Para cada um dos meios, deixou-se arrefecer a 45°C após esterilização, distribuíram-se por cápsulas de Petri e deixaram-se solidificar.

(b) Preparação da suspensão de terra

Aqueceu-se a 110°C 1 g de terra quente durante 1 hora numa estufa de ar. Após arrefecimento suspendeu-se a terra em água destilada e agitou-se bem. Deixou-se sedimentar a terra e utilizou-se o sobrenadante para a inoculação de cada um dos meios de isolamento anteriormente referidos.

(c) Inoculação do meio de isolamento

Inocularam-se cápsulas de Petri con-
tendo cada uma 50 mL de um dos meios de isolamento ante-
riormente referidos com 1 mL e cada uma da suspensão de
terra.

(d) Isolamento de Streptomyces sp. Y-84, 36210

Incubaram-se as placas de Petri ino-
culadas durante 10 dias a 37°C e isolou-se a partir dos
microorganismos que cresceram a estirpe Streptomyces sp.
Y-84, 36210.

Exemplo 2

Cultura de Streptomyces sp. Y-84, 36210 para a prepara-
ção fermentativa de camunocina

Cultivou-se Strptomyces sp. Y-84,
36210 em agar de levedura-malte com a seguinte composi-
ção:

Extracto de malte	10,0 g
Extracto de levedura	4,0 g
Glucose	4,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1 L
pH	7,0

Distribuiu-se o meio por tubos de
ensaio e esterilizou-se durante 30 minutos a 121°C. Ar-
refeceram-se os frascos de reagente nos tubos inclinados
a fim de preparar cunhas de agar. As cunhas de agar fo-
ram inoculadas com a cultura e incubadas durante 10 a 15
dias a 28°C, observando-se um bom crescimento e a forma-
ção de esporos. Utilizou-se uma suspensão dos esporos
de uma cunha de agar em água destilada para inocular 5 ba

lões de Erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo cada um 100 ml de meio de inoculação ou 1 balão de aspiração de 5 L de capacidade contendo 1 L do mesmo meio de inoculação.

Composição do meio de inoculação

Glucose	15,0 g
Farinha de semente de soja	15,0 g
Água de maceração de milho	5,0 g
CaCO ₃	2,0 g
NaCl	5,0 g
Água destilada	1 L
pH	6,5

O meio anteriormente descrito foi distribuído por balões de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade em porções de 100 mL ou por frascos de aspiração de 5 L de capacidade em porções de 1 L em cada um e foi esterilizado durante 30 minutos a 120°C. Arrefeceram-se os balões ou os frascos, inocularam-se com a suspensão dos esporos e deixaram-se em agitação durante 72 horas a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e a 240 r.p.m. num agitador orbital com uma amplitude de 3,8 cm (1,5 polegadas). O produto desta cultura foi utilizado para inocular dois fermentadores de vidro de 15 L com 10 L de um meio de inoculação numa porção de 8 a 10 vol.% para a realização da 2ª fase da cultura de inoculação. A fermentação foi levada a efeito a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com agitação entre 180 e 200 r.p.m. e com um caudal de arejamento de 6 a 7 L/min. por um período de 24 horas. A cultura de inoculação da 2ª fase bem crescida assim obtida foi utilizada para inocular o meio de preparação.

Composição do meio de preparação.

Glucose	15,0 g
Amido solúvel	20,0 g



Farinha de soja	3,0 g
Peptona	3,0 g
CaCO ₃	2,0 g
NaCl	2,0 g
Água de maceração de milho	2,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
Água destilada	1 L
pH	6,5

Adicionou-se ao conteúdo do fermentador 0,025 % de Desmophen como anti-espumante.

Transferiram-se 280 L do meio anteriormente referido para um fermentador de 390 L. O meio foi esterilizado por meio de vapor indirecto ou directo durante 28 minutos a 121°C. Arrefeceu-se o fermentador e inoculou-se com a 2ª fase da cultura de inoculação (7 % em volume). A fermentação foi levada a efeito a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com agitação a uma velocidade de 100 a 120 r.p.m.. O caudal de arejamento foi de 170 L/minuto. Quando a fermentação foi feita parar após 40 a 45 minutos os diâmetros das zonas de inibição contra os Staphylococcus aureus 209 P eram de 20 mm na análise do filtro de cultura de acordo com o método das cápsulas de agar (6 mm de diâmetro) com utilização de agar suplementado com cálcio (30 mM) a um valor de pH do meio de cultura entre 6,5 e 6,9.

O volume celular sedimentado foi de 20 %.

O caldo de fermentação concentrado contendo o complexo antibiótico foi centrifugado para separação do micélio do líquido e foi processado conforme descrito no Exemplo 4.

Exemplo 3

Cultura de Streptomyces sp. Y-84, 36210 para a preparação fermentativa de camunocina

Repetiu-se o processo descrito no Exemplo 2 sob as condições seguintes:

Cultivou-se Str. sp. Y-84, 36210 num meio de agar com a seguinte composição:

Amido (solúvel)	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0 g
NaCl	1,0 g
(NH ₂) ₂ SO ₄	2,0 g
CaCO ₃	2,0 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
MoCl ₂ . 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1 L
pH	7,2 g

A composição do meio de inoculação era igual à descrita no Exemplo 2.

Composição do meio de produção

Glucose	20,0 g
Farinha de semente de soja	10,0 g
CaCO ₃	0,2 g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	1,0 mg
Água destilada	1 L
pH	7,0

Carregaram-se 100 L do meio anteriormente descrito num fermentador de 150 L de capacidade. Esterilizou-se o meio durante 28 minutos a 121°C por vapor

indirecto e directo. Arrefeceu-se o fermentador e inoculou-se com a 2ª fase da cultura de inoculação (9 vol. %). A fermentação foi levada a efeito a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com agitação de 80 a 90 r.p.m. com um caudal de arejamento de 60 a 10 L/minuto. Fez-se parar a fermentação após 40 a 45 minutos e determinou-se que o pH do caldo de cultura era de 6,45 e o diâmetro das zonas de inibição contra Staphylococcus aureus 209 P era de 22 mm na análise do filtrado da cultura de acordo com o método das cápsulas de agar (6 mm de diâmetro) utilizando agar suplementado com cálcio (30 mM). O volume celular sedimentado era de 12 % em volume. O caldo de fermentação foi tratado conforme se descreve no Exemplo 5.

Exemplo 4

Fizeram-se passar 250 ml do filtrado da cultura obtido de acordo com o Exemplo 2 através de uma coluna contendo 6 L de resina permutadora aniónica Amberlite^(R) IRA 68 (Cl^-) (resina permutadora com funcionalidade de poliestireno-poliamina). Após lavagem com 40 L de água desmineralizada eluiu-se a coluna com solução de NaCl 2,0 M a pH 8,5 (ajustado com amónia). Os eluídos activos obtidos (30 L) foram extraídos 3 vezes com uma mistura acetato de etilo: n-propanol 2:1 depois de se ter ajustado o pH com HCl até ao valor 4,0. Os extractos foram concentrados sob vácuo e o concentrado obtido deste modo (6,1 g) foi feito passar através de uma coluna de gel de sílica (dimensão de partícula 0,062 a 0,037 mm (230 a 400 malhas, 600 g) e foi eluído com um gradiente de clorofórmio até clorofórmio: metanol (1:1). As fracções activas concentradas reunidas (3 g) foram extraídas com solução de NaHCO_3 aquosa saturada e em seguida o pH do extracto foi ajustado a 4,0 com HCl, efectuando uma nova extracção com a mistura acetato de etilo: n-propanol 2:1. O extracto foi concentrado sob vácuo, dando 1,8 g do composto, e em seguida foi feito passar através



de uma coluna de cromatografia de gel de sílica (dimensão da partícula 0,062 a 0,037 mm (230 a 400 malhas), 360 g). A eluição foi efectuada com um gradiente de acetato de etilo até uma proporção acetato de etilo: metanol (1:1), obtendo-se 860 mg de material activo por concentração. Este material foi dividido em 6 porções e foi separado numa coluna contendo 50 g de Sephadex^(R) LH.20 (material de filtração em gel hipofílico) em metanol; como agente de eluição utilizou-se metanol. Deste modo foram obtidos 360 mg de camunocina.

Exemplo 5

Os filtrados das culturas de duas cargas de fermentação de acordo com o Exemplo 3 foram reunidos, obtendo-se um volume de 185 L. Este volume foi feito passar através de uma coluna contendo 4 L de Amberlite^(R) IRA-68 (Cl⁻); a coluna foi lavada com 20 L de água desmineralizada e foi eluída com solução aquosa de cloreto de sódio 2,0 M cujo pH tinha sido ajustado a 8,5 com amónia. Os eluídos activos obtidos num volume de 47 L foram feitos passar através de uma coluna com 3 L de Diaion^(R) HP-20 (material adsorvente polimérico, Soc. Mitsubishi Chemical Industries, Japão); a coluna foi lavada com 7 L de água desmineralizada e foi eluída com metanol. O pH foi ajustado a 3,0 com HCl e a solução foi feita passar através de uma coluna contendo 2 L de Diaion HP-20. A coluna foi lavada com água desmineralizada até se verificar a ausência de iões cloreto na água de lavagem. A camunocina foi eluída com metanol; os eluídos de metanol foram concentrados sob vácuo e foram liofilizados. Obtiveram-se deste modo 21 g do complexo antibiótico bruto.

O complexo antibiótico bruto foi dissolvido em água bidestilada, o pH foi ajustado a 1,7 com amónia, a solução foi dividida em duas partes de igual volume e foi feita passar através de duas colunas de

6,4 x 84 cm contendo Sephadex^(R) LH-20 em água bidestilada. As colunas foram eluídas com água bidestilada com um caudal de 0,5 ml por minuto e o eluído foi colhido em fracções de 20 mg. As fracções activas do eluído num volume total de 1,1 L foram liofilizadas, obtendo-se 8 g do complexo antibiótico. Este material foi ainda purificado por uma nova cromatografia através de uma coluna contendo Sephadex^(R) LH-20 de modo idêntico ao acima descrito, obtendo-se 4,45 g de complexo antibiótico de pureza intermédia.

Este complexo antibiótico de pureza intermédia foi dissolvido em 200 ml de água bidestilada e foi feito passar através de uma coluna (6,2 x 26 cm) contendo DEAE-Sephadex^(R) A-25 (permutador iónico com funcionalidade de dietilamimetil) em água bidestilada. A coluna foi enxaguada com água e em seguida eluída com uma solução aquosa de NaCl, cuja molaridade era gradualmente aumentada por incrementos de 5 %. O complexo antibiótico foi eluído em 6 L de uma solução de NaCl 1,5 M e 5 L de uma solução de NaCl 2 M. Os eluídos combinados, cujo pH foi ajustado a 2,0 com HCl, foram em seguida feitos passar através de uma coluna contendo 2 L de Diaion^(R) HP-20; a coluna foi enxaguada com água até que a água não apresentasse à saída iões cloreto detectáveis e em seguida foi eluída com metanol. O metanol foi eliminado por destilação sob vácuo e a solução aquosa restante foi liofilizada, obtendo-se 700 g de camunocina pura.

Exemplo 6

A análise por HPLC do complexo antibiótico da camunocina puro numa coluna contendo DDS-Hyper^(R) sil (10 μ m) de dimensão 4 x 120 mm usando como eluente uma mistura constituída por MeOH e ácido acético aquoso a 1 % (55:45) com um caudal de 0,5 ml por minuto e detecção a 234 nm mostra que a camunocina é uma mistura mi-

cro-heterogénea, isto é, um complexo formado por distintos compostos antibióticos, conforme mostra a Figura 2.

A camunocina foi hidrolisada com HCl 6 N e o produto da hidrólise obtido deste modo foi analisado após metilação e trifluoroacetilação por meio de GC-EIMS (cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa de choque do electrão) e de GC-CIMS (cromatografia em fase gasosa - espectroscopia de massa com ionização química) utilizando um cromatógrafo de gás Perkin Elmer com 3 % de OV-1 numa coluna de Gaschromon Q com um espectrómetro de massa AEI MS-9025 acoplado e um sistema de processamento de dados "on-line" DS-50.

Por meio desta análise verificou-se a presença dos seguintes ácidos aminados:

Componentes principais:	ácido α -aminoadípico
	ácido aspártico
	glicina
	4-hidroxifenilglicina
	serina

Componentes secundários:	ácido glutâmico
	ácido 3-hidroxiaspártico
	leucina
	N-metilfenilglicina
	prolina
	treonina

A partir dos dados anteriores chega-se à conclusão que a camunocina é um complexo antibiótico peptídico.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de camunocina caracterizado por se cultivar *Streptomyces species* Y-84, 36210 (DSM 4329) ou um seu variante ou mutante sob condições aeróbicas num meio nutriente contendo fontes de carbono e de azoto e sais nutritivos bem como eventualmente elementos vestigiais, por se isolar a camunocina a partir do caldo de cultura e se purificar.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a cultura ser levada a efeito a uma temperatura entre cerca de 18 e 37°C e a um pH de cerca de 6 a 9.

- 3ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por a cultura ser levada a efeito a uma temperatura entre cerca de 26 e 28°C e a um pH de cerca de 6,4 a 6,6.

- 4ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 3 caracterizado por a cultura ser levada a efeito durante cerca de 40 a 45 horas.

- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 3 caracterizado por se proceder a uma cultura submersa.

- 25 -

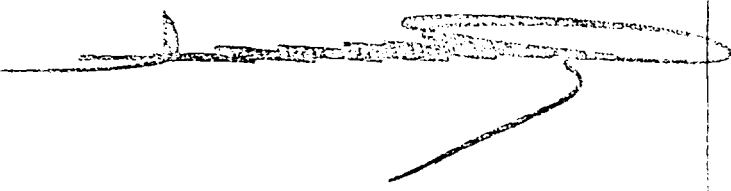
Processo para a preparação de uma composição farmacêutica dotada de actividade antibiótica e/ou immunosupressora caracterizado por se incorporar como princípio activo camunocina quando preparada de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores juntamente com adjuvantes e/ou substâncias veiculares habituais numa forma de apresentação apropriada.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã em 5 de Fevereiro de 1988, sob o nº P 38 03 383.6.

Lisboa, 3 de Fevereiro de 1989

• AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL.





R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CAMUNOCINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de camunocina que compreende cultivar-se *Streptomyces species* Y-84, 36210 (DSM 4329) ou um seu variante ou mutante sob condições aeróbicas num meio nutriente contendo fontes de carbono e de azoto e sais nutritivos bem como eventualmente elementos vestigiais, por se isolar a camunocina a partir do caldo de cultura e se purificar.