

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 94.204

NOME: PFIZER INC., norte-americana, industrial, em
235 East 42nd Street, New York, N.Y.10022
ESTADOS UNIDOS DA AMERICA DO NORTE

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE NOVOS ANTIBIO-
TICOS DE ETÉRES POLICÍCLICOS ACÍDICOS E
MICROORGANISMOS ÚTEIS NA SUA PRODUÇÃO"

INVENTORES: Edward Joseph Tynan, III

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

Estados Unidos da América do Norte, em 1 de Junho de 1989,
sob o No. PCT/US89/02400.

94.204

FFIZER INC.

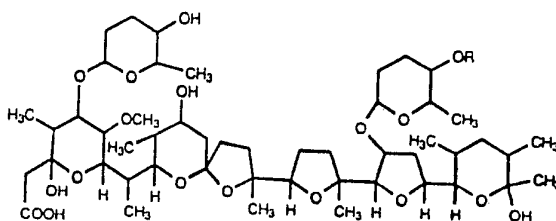
"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS DE ÉTERES POLI-
CÍCLICOS ACÍDICOS E MICROORGANISMOS ÚTEIS NA SUA PRODUÇÃO"

=====

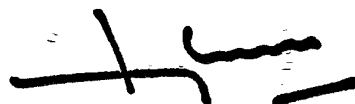
MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

Este invento está relacionado com o processo para a
produção de novos antibióticos de éteres policíclicos acídicos
CP-91 243 e CP-91 244 da fórmula



em que R é H em CP-91 243 e R é CH₃ em CP-91 244. O invento
também está relacionado com novos microorganismos Actinomadurea
roseorufa; métodos para o controle de infecções coccidias em
aves de capoeira, enterite em animais domésticos e disenteria em
equinos; métodos para a promoção do crescimento e/ou melhoramento
da eficácia da utilização de alimentos em animais ruminantes ou



- 2 -

monogástricos; e processo para a preparação de composições de ração nutrientes.

O referido processo de produção consiste na fermentação, num meio nutritivo aquoso contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos em condições de fermentação aeróbia submersa, de um mutante do microorganismo Actinomadurea roseorufa, tendo o referido microorganismo as características de identificação da AfCC 53666, ou de um outro seu mutante, transformante ou recombinante, sendo o referido mutante, outro mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir o referido antibiótico.

Este invento está relacionado com novos antibióticos de éteres policíclicos acidícos e seus sais catiónicos farmacêuticamente aceitáveis. Este invento também está relacionado com novos microorganismos Actinomadura roseorufa. Ainda, este invento relaciona-se com processos para a produção de novos antibióticos de éteres policíclicos acidícos UK-58,852. Este invento está também relacionado com métodos para o controle de infecções coccidiais em aves, enterite em animais domésticos e disenteria em suínos através da administração dos novos antibióticos deste invento aos referidos animais. Este invento também se relaciona com composições em nutrientes para alimentos compreendendo os novos antibióticos deste invento e com métodos para a promoção do crescimento e/ou melhoramento da eficácia de utilização de alimentos em animais ruminantes ou monogástricos pela administração dos novos antibióticos deste invento.

Os antibióticos de éteres policíclicos acidícos são uma classe de compostos caracterizados pelos seus efeitos no transporte de catiões em mitocôndrias. Esta família de antibióticos inclui agentes bem conhecidos tais como monensina; nigericina; grisorixina; dianemicina; salinomycin; mutalomicina; ionomicina e leuseramicina. O tema foi revisto por Westley, «Polyether Antibiotics», Adv. Appl. Microbiol., 22, 177, 1977.

Os antibióticos de éteres policíclicos referidos imediatamente atrás são activos contra bactérias Gram-positivas, fungos e protozoários. Em particular, aqueles antibióticos apresentam potente actividade anti-coccídeos. Eles têm pois, sido usados com níveis de sucesso variáveis no tratamento de uma variedade de infecções de animais.

A coccidiose, doença bem conhecida causada por um protozoário, continua a ser um problema sério e o seu controle

reveste-se de importância económica em veterinária, especialmente na indústria de aves. A coccidiose resulta da infecção por uma ou mais espécies de *Eimeria* ou *Isospora* (para um resumo, consultar Lund e Farr em «Diseases of Poultry» 5ª ed., Biester e Schwarte, Eds., Iowa State University Press, Ames, Ia., 1965, pp.1055-1096). Existem seis espécies de coccídeos que produzem morbidez facilmente discernível em aves susceptíveis. *Eimeria tenella*, *E. paratix*, *E. brunetti*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. mivati* produzem danos directamente através da destruição de células epiteliais do tracto digestivo ou indirectamente através da produção de toxinas. Três outras espécies de protozoários pertencentes ao mesmo género são consideradas como sendo relativamente inócuas; no entanto, *E. mitis*, *E. hagani* e *E. praecox* são capazes de reduzir o ganho de peso, baixar a eficácia dos alimentos e afectar adversamente a produção de ovos.

Face às grandes perdas económicas devido à coccidiose e às desvantagens conhecidas dos agentes anti-coccídeos existentes, continua a procura de melhores agentes anti-coccidiais.

A enterite é uma outra doença que pode provocar graves perdas económicas aos produtores de animais. A enterite ocorre em galinhas, suínos, gado vacum e carneiros e é atribuída principalmente a bactérias anaeróbias, particularmente *Clostridium perfringens* e vírus. A enterotoxemia em ruminantes, um exemplo da qual é a «doença de excesso de alimentação» em carneiros, é uma doença devida à infecção por *C. perfringens*.

A disenteria em suínos é uma das doenças de porcos mais vulgarmente diagnosticadas nos Estados Unidos. Por outro lado a doença prevalece em muitos outros países e anualmente causa perdas consideráveis no «stock» de criadores de suínos em todo o mundo. Foi recentemente descoberto que uma espiroqueta grande é o

organismo causador da doença. Este organismo, Treponema hyodysenteriae, foi agora isolado e mostrou-se ser capaz de induzir a doença [Harris, D. L. et al., «Swine-Dysentery-1, Inoculation of Pigs with Treponema hyodysenteriae (New species) and Reproduction of the Disease», Vet. Med/SAC, 67, 61-64, 1972]. Deve-se notar que se desconhece se T. hyodysenteriae é o único organismo causador da disenteria em suínos. No entanto, a partir dos dados disponíveis, pode-se concluir que é a principal fonte de infecção.

O aumento do rendimento (maior taxa de crescimento e/ou melhor eficácia da utilização de alimentos) em ruminantes tais como gado vacum, e em animais monogástricos tais como porcos, é um outro objectivo economicamente pretendido em veterinária. É de particular interesse a melhoria do rendimento conseguida aumentando a eficácia da utilização de alimentos. É conhecido o mecanismo de utilização da principal fracção nutritiva dos alimentos de ruminantes. Os microorganismos no rumen dos animais degradam os açúcares para produzirem monossacáridos e depois converterem estes monossacáridos em compostos de piruvato. Os piruvatos são metabolizados por processos microbiológicos para formar acetatos, butiratos ou propionatos, colectivamente conhecidos como ácidos gordos voláteis. Para uma discussão mais detalhada consultar Leng em «Physiology of Digestion and metabolism in the Ruminant», Phillipson et al., Eds., Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, England, 1970, pp. 408-410.

A eficácia relativa da utilização de ácidos gordos voláteis está discutida por McCullough em «Feedstuffs», 19 de Junho, 1971 página 19; Eskeland et al., em J. An. Sci., 33, 282, 1971; e Church et al., em «Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants», Vol. 2, 1971, pp. 622 e 625. Se bem que os acetatos e butiratos sejam utilizados, os propionatos são utilizados com

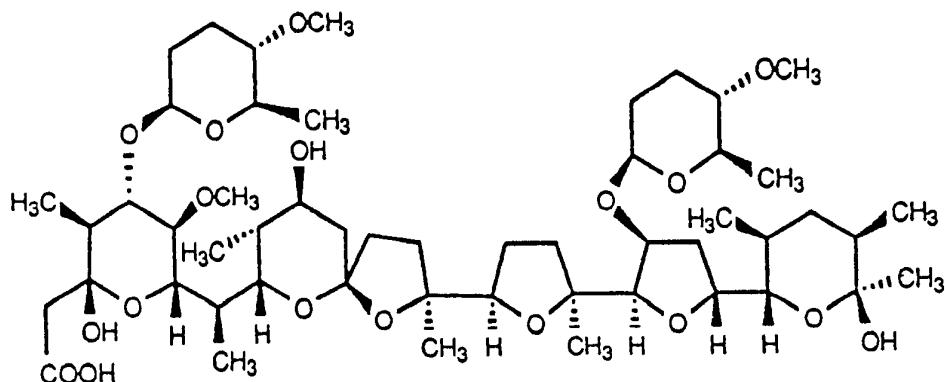
maior eficácia. Ainda, quando existe demasiado pouco propionato os animais podem desenvolver cetose. Portanto um composto benéfico estimula os animais no sentido de produzirem uma proporção mais elevada de propionatos a partir de açúcares, aumentando pois a eficácia de utilização de açúcares e também reduzindo a incidência de cetose.

Ainda uma outra doença que provoca perdas económicas aos produtores de animais é causada pelo parasita protozoário Theileria parva. Aquela doença, teileriose, é também conhecida como «Febre da Costa Este», «Febre Costeira» ou «Febre da Cerraça Rodésiana». O parasita Theileria invade mas não destrói os eritrócitos o que dá origem a infecções febris agudas ou crónicas. No gado vacum a doença é caracterizada por febre elevada, inchaço dos nódulos linfáticos, emagrecimento e mortalidade elevada. A doença é um problema muito sério na África Este e Central. Consultar ainda «The Merck Veterinary Manual», Siegmund et al., Eds., Merck & Co., Rahway, N.J., 5ªEd., pp. 431-433 (1979).

U.S. 4,746,650 descreve a produção de UK-58,852 através da cultura de Actinomadura roseorufa Huang Sp. Nov., AfCC 39697 num meio nutritivo aquoso em condições de anaerobiose submersa. UK-58,852 é aqui descrito como um novo antibiótico de éter policíclico ácido da fórmula

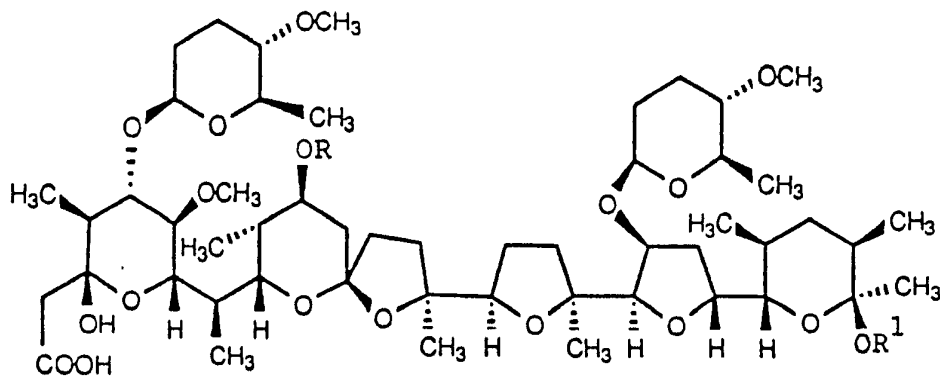
[Handwritten signature]

- 7 -



(I)

Na fermentação da referida *Actinonadura roseoprufa* Huang sp. nov., ATCC 39597, também são produzidos dois componentes menores, que estão relacionados, cada um dos quais é eficaz como antibiótico no controle da coccidiose. Os dois componentes menores são as fórmula (II), abaixo, onde R é H e R¹ é CH₃; e R e R¹ são ambos CH₃, respectivamente

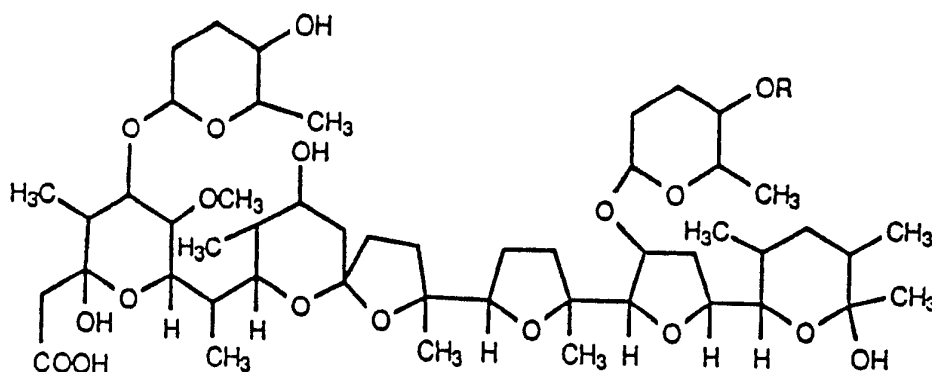


(II)

Este invento diz respeito a dois novos antibióticos de éteres policíclicos ácidos, aqui designados CP-91,243 e CP-91,244, tendo a fórmula

[Handwritten signature]

- 3 -



(III)

onde R é H para o antibiótico CP-91,243 e R é CH₃ para o antibiótico CP-91,244. Estão também incluídos no âmbito deste invento sais catiónicos dos referidos antibióticos.

Ainda, este invento está relacionado com novos microorganismos que são mutantes obtidos a partir de Actinomadure roseorufa tendo as características de identificação de ATCC 53666. Os novos microorganismos deste invento são capazes de produzir, através de cultura, CP-91,243 e/ou CP-91,244. Os novos microorganismos são Actinomadure roseorufa tendo as características de identificação de ATCC 53869 e de ATCC 53867. Este invento também diz respeito a outros mutantes, transformantes e recombinantes dos referidos novos microorganismos os quais são capazes de produzir, através de cultura, CP-91,243 e/ou CP-91,244. Ainda, este invento diz respeito a novos microorganismos que são mutantes obtidos a partir de Actinomadure roseorufa tendo as características de identificação de ATCC 53666 e ainda seus mutantes, transformantes e recombinantes todos eles além de produzirem CP-91,243, e/ou CP-91,244 quando cultivados, também produzem UK-58,852. Ainda, este invento relaciona-se com processos para a produção de CP-91,243, CP-91,244 e o antibiótico conhecido de

éter policíclico ácido UK-58,852 através da cultura dos novos microorganismos deste invento. Este invento também diz respeito a métodos para o controle de infecções por coccídios em aves, enterite em animais domésticos tais como galinhas, suínos, gado vacum e carneiros e disenteria em suínos através da administração de CP-91,243 e/ou CP-91,244 sôzinhos ou em combinação com UK-58,852 ao referido animal. Estão também dentro do âmbito deste invento, métodos para a promoção do crescimento e/ou utilização de alimentos em ruminantes e animais monogástricos o qual se caracteriza pela administração, aos referidos animais, de CP-91,243 e/ou CP-21,244 individualmente ou em combinação um com o outro e/ou UK-58,852. Ainda, este invento é dirigido a composições de nutrientes para alimentos que compreendem CP-91,243 e/ou CP-91,244 sôzinhos ou em combinação com UK-58,852.

O termo «Actinomadura roseorufa» tendo as características da...» conforme aqui é usado e nas reivindicações apenas deverá incluir a cultura depositada na ATCC à qual tal termo se refere assim como quaisquer outros microorganismos de Actinomadura roseorufa que tenham as mesmas características de identificação da cultura depositada referida por tal termo.

Os novos antibióticos de éteres policíclicos ácidos CP-91,243 e CP-91,244 são produzidos por microorganismos obtidos pela mutação de uma estirpe de Actinomadura roseorufa Huang sp. nov. tendo as características de identificação de ATCC 53666 como descrito abaixo. Actinomadura roseorufa ATCC 53666 como descrito abaixo. Actinomadura roseorufa ATCC 53666 foi depositada sob os termos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection, Rockville, Maryland em ligação com o pedido de patente U.S. pendente do requerente nº de série 113,563, entregue em 26 de Outubro de 1987 e atribuído ao presente procurador. Todas as sobre a disponibilidade ao público do microorganismo

serão irrevogavelmente retiradas quando da concessão da patente. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) foi usado como mutagênio. Colonias isoladas do microorganismo tratado foram então examinadas quanto ao seu perfil de produção. O processo geral compreendeu o crescimento de AfCC 53566 num meio nutritivo aquoso em condições de aerobiose submersas com agitação a uma temperatura de 28°C. A escolha do meio para o estudo do crescimento não é crítico.

Um meio adequado consiste em cerelese (10,0 g), amido de milho (5,0 g), melaço de milho (5,0 g), N-Z Amine YTT (5,0 g), (Marca Registrada para a digestão enzimática de caseína, Humko Sneffield Chemical Co. Inc.), e cloreto de cobalto (0,002 g) que foi suspenso em um litro de água, pH ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio e colocado num frasco Fernbach. Após esterilização por autoclavagem, os frascos foram inoculados com uma suspensão de crescimento em rampa ou com micélio vegetativo, depois incubado com agitação num agitador a cerca de 200 rev/min e uma temperatura de 28°C durante sete a oito dias. Retirou-se então uma amostra de 50 ml e o micélio homogenizado num homogenizador de tecidos com um pistão de Teflon seguido de sonicação. O micélio fragmentado foi então centrifugado, lavado para retirar o meio, ressuspensão em 50 ml de meio fresco num frasco Erlenmeyer de 300 ml e incubado por agitação a 32°C durante duas horas. Em seguida as células foram novamente centrifugadas, lavadas para remover o meio e ressuspensões em 50 ml de tampão tris(hidroximetil)-amino-metano-malato, pH 9,0. Amostras desta suspensão foram tratadas com NTG em concentrações de 750 µg/ml a 1500 µg/ml durante uma hora num agitador rotativo de banho-maria a 250 a 300 rev/min. e uma temperatura de 34°C. Após tratamento, as células foram centrifugadas, lavadas para remover o mutagênio e amostras foram diluídas seriadamente, semeadas num meio nutritivo sólido e as placas incubadas a 28°C até as unidades formadoras de colônias

terem tamanho suficiente para a transferência para rampas. Um meio adequado para para as placas e rampas é o Meio ATCC Nº 172 com N-Z Amine Type A (Hunko Sheffield Chemical Co. Inc.) baixado para 1,0 g/l. As rampas inoculadas foram deixadas crescer a 28°C durante 10 a 14 dias após o que elas estavam prontas para testar. Isto foi feito por inoculação de frascos Erlenmeyer de 300 ml contendo 25ml de um meio adequado (um destes meios contem cereais, 45,0 g; farinha de soja 10,0 g; melão 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; um litro de água e o pH do meio foi ajustado a 7,0). Após esterilização por autoclavagem durante 30 minutos a 121°C, os frascos foram inoculados com suspensões individuais de crescimentos em rampas e incubados com agitação a 28°C num agitador rotativo durante 7 dias. As culturas mutantes foram detectadas por examinação de extractos de metilisobutilcetona dos caldos totais colhidos após revelação das placas de cromatografia em camada fina (silica gel) por vaporização com reagente de vanilina e aquecimento a 100°C durante cinco minutos. O sistema de revelação foi composto por 9 partes de clorofórmio para 1 parte de metanol que deu valores de Rf de aproximadamente 0,2 para CP-91,243, cerca de 0,4 para CP-91,244 e cerca de 0,7 para UK-58,852. Duas culturas mutantes foram assim obtidas produtoras de CP-91,243 CP-91,244 e UK-58,852. Aquelas mutantes foram identificados na colecção de culturas da Pfeizer Inc. como FD 28466 e FD 28518. As características morfológicas e de cultura dos mutantes assim obtidos são essencialmente as descritas para A. roseorufa ATCC 53666. A característica que distingue estes mutantes é a sua capacidade para produzir uma mistura de CP-91,243 e CP-91,244.

A cultura dos mutantes e isolamento dos antibióticos CP-91,243 e CP-91,244 pode ser efectuada em condições semelhantes às empregues em fermentações anteriores que dão antibióticos de

- 12 -

ésteres policíclicos. Consultar, por exemplo, Patente U.S. 4,361,649. A cultura de preferência desenvolve-se em meio nutritivo aquoso, de preferência em condições de aerobiose submersa com agitação a uma temperatura de 24°C a 36°C. Meios nutritivos úteis para a cultura incluem uma fonte assimilável de carbono como sejam açúcares, amidos e glicerol; uma fonte de azoto orgânico como sejam caseína, produtos da digestão enzimática da caseína, farinha de soja, farinha de sementes de algodoeiro, farinha de amendoim, gluten de trigo, farinha de soja, farinha de sangue, farinha de carne e farinha de peixe. Podem também ser usada com resultados vantajosos uma fonte de substâncias de crescimento como seja grãos solubilizados, farinha de peixe, farinha de sementes de algodoeiro e extracto de levedura assim como sais minerais como sejam cloreto de sódio e carbonato de cálcio e micronutrientes tais como ferro, magnésio, cobre, zinco, cobalto e manganês. Se durante a fermentação se formar espuma excessiva, podem ser adicionados ao meio de fermentação agentes anti-espuma tais como óleos vegetais ou silicones. O arejamento do meio em vasos para o crescimento submerso é de preferência mantido a uma velocidade de 1/2 a 2 volumes de ar estéril por volume de caldo de fermentação por minuto forçado para o caldo através de um pulverizador. A agitação pode ser mantida por meio de agitadores de um modo geral familiares para os que estão dentro da área da fermentação. A velocidade de agitação depende do tipo de agitador empregue. Geralmente usa-se um balão de agitação agitado entre 150 e 300 ciclos por minuto enquanto que um fermentador normalmente é agitado entre 300 e 1700 revoluções por minuto. Devem ser mantidas condições assépticas ao longo da transferência do microorganismo e durante o seu crescimento.

O inóculo para a preparação dos antibióticos de acordo com este invento pode ser obtido empregando crescimento de uma rampa da cultura de microorganismo pretendida deste invento ou

frascos Roux inoculados com a referida cultura ou uma suspensão de micélio descongelado da referida cultura. Um meio sólido adequado para o crescimento inicial do microorganismo em rampas e frascos Roux é o meio ATCC Nº 172. O meio líquido anteriormente referido no estudo de mutação é adequado para preparar o micélio vegetativo antes da congelação. O crescimento resultante pode ser usado para inocular frascos de agitação ou vasos de inóculo ou os frascos de inóculo podem ser semeados a partir dos frascos de agitação. O crescimento máximo em frascos de agitação é geralmente atingido em 4 a 8 dias, enquanto o inóculo em vasos de inóculo submersos estarão no seu período mais favorável em 4 a 5 dias.

O progresso da produção de antibiótico durante a fermentação pode ser controlado qualitativamente por cromatografia em camada fina após visualização por vaporização com reagente de vanilina conforme anteriormente descrito ou a placa revelada pode também ser coberta com agar de infusão de cérebro e coração semeado com Bacillus subtilis e incubado a 37°C durante 16 horas para visualizar os antibióticos. A cromatografia em camada fina é também um método útil para a análise da composição de materiais brutos e purificados extraídos a partir do caldo de fermentação.

Os antibióticos CP-91,243, CP-91,244 e UK-58,652 produzidos pela fermentação dos referidos mutantes acumulam-se no micélio e no caldo e podem ser separados e recuperados por extracção do caldo de fermentação não filtrado e colhido como um todo, i.e., todo o caldo, com um solvente orgânico tal como clorofórmio, acetato de etilo, metilisobutilcetona ou butanol no pH naturalmente prevalente. Como alternativa, para evitar problemas graves de emulsão o micélio é separado e ele e o caldo clarificado são extraídos individualmente com um solvente orgânico. Os extractos de solvente são concentrados para um xarope fino

e obtêm-se CP-91,243, CP-91,244 e UK-58,852 puros por cromatografia em coluna.

Um método típico de separação e recuperação dos antibióticos deste invento é como se segue: A totalidade do caldo da fermentação do mutante foi extraído com metilisobutilcetona. A evaporação do extracto in vacuo deu um óleo avermelhado que foi aplicado numa coluna de sílica gel. A coluna de sílica gel foi então eluída com clorofórmio/metanol (19:1) e os eluatos examinados por cromatografia em camada fina. As fracções enriquecidas em CP-91,243, CP-91,244 e UK-58,852 foram combinadas e concentradas ou evaporadas até secagem. Cada uma das fracções contendo antibiótico que tinha sido evaporada até à secagem foi então dissolvida em acetato de etilo e as fracções aplicadas em colunas individuais de sílica gel. As colunas de sílica gel foram então eluídas com acetato de etilo e novamente os eluatos foram examinados por cromatografia em camada fina. As fracções contendo CP-91,243 e CP-91,244 foram cristalizadas a partir de acetato de etilo enquanto que UK-58,852 foi cristalizado a partir de hexano.

Os antibióticos deste invento podem ser recuperados a partir da fermentação em associação com o micélio por evaporação do caldo total por métodos conhecidos, incluindo secagem por vaporização ou por separação do micélio do caldo por filtração ou centrifugação. Os produtos de micélio assim obtidos compreendem os antibióticos na superfície do micélio e nos seus interstícios tornando o micélio um veículo útil.

Os mutantes identificados na colecção de culturas da Pfizer Inc. como FD 28455 e FD 28518 foram depositados nos termos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, um depositário conhecido que garante a permanência dos depósitos e fácil acesso a eles pelo público se

for concedida patente a este pedido. A cultura FD 28455 foi dada a designação de Actinomadura roseorufa ATCC 53869. A cultura FD 28518 foi dada a designação Actinomadura roseorufa ATCC 53870. Os depósitos estão disponíveis durante a pendência deste pedido a alguém determinado pelo Commissioner of the United States Patent and Trademark Office a serem referidos como 37 C.F.R. 1,14 e 35 U.S.C. 122 e de acordo com as leis estrangeiras sobre patentes em países em que tenham sido entregues as contrapartes deste pedido ou pedidos dele derivados. Todas as restrições sobre a disponibilidade ao público do microorganismo depositado serão irreversivelmente retiradas quando da concessão da patente.

As características de cultura de Actinomadura roseorufa ATCC 53869 e ATCC 53870 são substancialmente as mesmas das de Actinomadura roseorufa 53666 com excepção de ATCC 53869 e ATCC 53870 produzirem ainda CP-91,243 e CP-91,244.

As investigações taxonómicas de Actinomadura roseorufa ATCC 53666 foram efectuadas por L.H. Huang que forneceu as descrições que se seguem.

A cultura foi semeada numa rampa de caldo ATCC n2172 e cultivada durante quatro dias a 28°C num agitador. Centrifugou-se durante 20 minutos, lavou-se três vezes com água destilada estéril e semeou-se em meio normalmente usado para a identificação de membros das Actinomycetales.

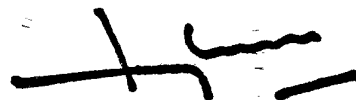
A cultura foi incubada a 28°C e os resultados foram lidos a diferentes tempos mas de um modo geral foram tirados aos 14 dias. As cores estão descritas na terminologia vulgar, mas as cores exactas foram determinadas por comparação com tiras de cores do Color Harmony Manual, Quarta edição. O método de análise de aminoácidos totais celulares é o descrito em Becker et al.,

Appl. Microbiol., 12, 421-423, 1964. Os açúcares totais celulares foram analisados pelos métodos descritos em Lechevalier, J., Lab. Clin. Med., 71, 934-944, 1968; e em Stanek e Roberts, Appl. Microbiol., 28, 226-231, 1974. Para fins de comparação usou-se a cultura tipo de Actinomyces roseorufa ATCC 39,697.

Os meios de identificação usados para a caracterização das culturas e referências para a sua composição como se segue:

1. Caldo de Tripton-Extracto de Levedura - (meio ISP #1, Difco).
2. Caldo de Extracto de Levedura-Extracto de Malte - (meio ISP #2, Difco).
3. Agar de Farinha de Agar - (meio ISP #3, Difco).
4. Agar de Sais Inorgânicos-Amido - (meio ISP #4, Difco).
5. Agar de Glicerol-Asparagina - (meio ISP #5, Difco).
6. Agar de Peptona-Extracto de Levedura e Ferro - (meio ISP #6, Difco).
7. Agar Czapek-Sacarose - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, meio nº 1, p. 328, 1961.
8. Agar Glucose-Asparagina - Ibid, meio nº 2, p. 328.
9. Agar de Bennett - Ibid, meio nº 30, p. 331.

10. Agar de Emerson - Ibid, meio nº 28, p. 331.
11. Agar Nutriente - Ibid, meio nº 14, p.330.
12. Agar com Tirosina de Gordon e Smith - R.E. Gordon e M.M. Smith, J. Bacteriol. 69: 147-150, 1955.
13. Agar de Caseína - Ibid.
14. Agar de Malato e Cálcio - S.A. Waksman, Bactriol. Rev. 21: 1-29, 1957.
15. Gelatina - R.E. Gordon e J.M. Mihm, J. Bacteriol. 73: 15-27, 1957.
16. Amido - Ibid.
17. Caldo de Nitrato Orgânico - Ibid.
18. Caldo de Nitrato e Dextrose - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, meio nº 1, p. 328, 1961, com por 30 g de sacarose substituído por 3 g de dextrose e omitido o agar.
19. Agar de Batata e Cenoura - M.P. Lechevalier, J. Lab. and Clinical Med. 71: 934-944, 1968, mas usando apenas 30 g de batatas, 2,5 g de cenouras e 20 g de agar.
20. Agar a 2% em água da torneira.
21. Agar Mineral #1 de Gauze - G.F. Gauze et al., Problems in the Classification of Antagonistic Actinomycetes, English Ed., p. 13, 1957.



- 18 -

22. Agar Orgânico #2 de Gauze - Ibid.
23. Leite Desnatado - Difco.
24. Utilização de Celulose -
 - a) H.L. Jensen, Proc. Linn. Soc. N.S.W. 55: 231-248, 1930.
 - b) M. Levine e H.W. Schoenlein, A Compilation of Culture Media, meio nº 2511, 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 Açúcares - Ibid.
27. Hidrólise de Hipurato e Esculina - Ibid.
28. Decomposição de Adenina, Hipoxantina, Xantina e Ureia - Ibid.
29. Resistência à Lisozima - Ibid.
30. Utilização de Açúcares - Meio C-2, H. Nonomura e Y. Ohara, J. Ferment. Technol. 49: 887-894, 1971.
31. Gama de Temperaturas - Meio ATCC 172 no ATCC Culture Collection Catalogue, 15ªed., p.608, 1982.

Uma descrição da cultura de Actinomyces roseorufus
ATCC 53666

Agar de Extracto de Levedura- Extracto de Malte - Bom crescimento vermelho rosado a vermelho (5 1/2ia, 7ia, 6ia, erecto, ondulado, com micélio aéreo branco; face inferior vermelha (7ia); sem pigmentos solúveis.

Agar de Farinha de Aveia - Crescimento moderado, creme (2ca), ligeiramente levantado, liso ou aparecendo como colónias isoladas; micélio aéreo inexistente ou esparso, branco; face inferior creme (2ca) ; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Sais Inorgânicos-Amido - Crescimento fraco a moderado, incolor a creme (2ca), fino, liso; micélio aéreo inexistente a esparso, branco; face inferior igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Glicerol-Asparagina - Crescimento fraco a moderado, creme (2ca), com pontos rosa a vermelho (6ea, 6 1/2ea); micélio aéreo inexistente a esparso, branco; face inferior incolor a creme (2ca), com pontos vermelhos; sem pigmento solúvel.

Agar Czapek-Sacarose - Crescimento fraco a moderado, creme (2ca), com pontos rosa a vermelho (5ea, 6 1/2ia); micélio aéreo inexistente ou esparso, branco; face inferior incolor a creme (2ca); sem pigmento solúvel.

Agar de Glucose-Asparagina - Crescimento moderado a bom, rosado a vermelho (6 1/2ga, 6 1/2na), erecto; liso, granulado a ondulado; micélio aéreo branco a rosa pálido (6ea); face inferior vermelha (6 1/2ga, 6 1/2ia); pigmento solúvel amarelado claro (3ca).

Agar de Tirosina de Gordon e Smith - Crescimento moderado a bom, rosa-laranja (5ea), moderadamente erecto, ondulado; micélio aéreo inexistente a esperso, branco; face inferior igual à superfície; pigmento solúvel amarelado (2ic).

Agar de Malato e Cálcio - Crescimento fraco, incolor, fino, liso, nenhum micélio aéreo; face inferior incolor; sem pigmento solúvel.

Agar de Caseína - Crescimento moderado a bom, rosa-laranja a laranja (4ia, 5ia), moderadamente erecto, ondulado sem micélio aéreo; face inferior amarelada a rosa pálido (3ga, 5aa); - com pigmento solúvel castanho (3ic).

Agar de Bennett - Crescimento bom, vermelho a vermelho escuro (6 1/2na, 6 1/2ng), erecto, ondulado; micélio aéreo branco a rosa (6ea); face inferior vermelha (6 1/2ic); com pigmento solúvel castanho (3ne).

Agar de Emerson - Crescimento bom a excelente, laranja (5ia, 5na), erecto, ondulado, com micélio aéreo branco; face inferior laranja (5ic); sem pigmento solúvel.

Agar Nutriente - Crescimento moderado, laranja pálido (5ea, 5ga), ligeiramente erecto, liso, ou aparecendo como colônias isoladas, sem micélio aéreo; face inferior laranja pálido (5ga); sem pigmento solúvel.

Agar de Gelatina - Crescimento moderado a bom, laranja pálido (4ga), moderadamente erecto, liso a ondulado; micélio aéreo esperso, branco; face inferior laranja pálido (4ga); sem pigmento solúvel.

Agar de Amido - Crescimento moderado a bom, laranja pálido (5ga), moderadamente erecto, liso a ondulado; micélio aéreo esparsos, branco; face inferior igual à superfície; sem pigmento solúvel.

Agar de Batata e Cenoura - Crescimento fraco a moderado, creme a rosa pálido (2ca, 4ca), fino a ligeiramente levantado; micélio aéreo esparsos, branco; face inferior creme a rosa pálido (4ca); sem pigmento solúvel.

Agar com Água da forneira - Crescimento pobre, incolor a creme (1 1/2ca), fino, liso; micélio aéreo esparsos, branco; face inferior igual à superfície; sem pigmento solúvel.

Meio Mineral 1 de Gauze - Crescimento moderado, rosa a vermelho (5ca, 61a), com pontos vermelhos (61c), ligeiramente levantado, liso; micélio aéreo inexistente a esparsos, branco; face inferior igual à superfície; sem pigmento solúvel.

Meio Orgânico 2 de Gauze - Crescimento moderado a bom, rosa-laranja (5ga), moderadamente levantado, ligeiramente ondulado; micélio aéreo esparsos, branco; face inferior igual à superfície; sem pigmento solúvel.

Propriedades Morfológicas - Após sete semanas de incubação, não se observou esporos em qualquer um dos meios usados. No entanto, em agar de batata e cenoura produziram-se dilatações terminais, laterais ou intercalares nas hifas; e eram singulares e lisas. Elas surgiram esféricas, ovais ou elípticas e mediam 1,2 a 2,5 mm de diâmetro ou 1,2-2,2 x 0,9-1,8 mm. Foram observadas estruturas semelhantes em agar de extracto de levedura e extracto de malte, agar de farinha de aveia, agar com água da

torneira, agar de gelatina, agar de Czapek-sacarose e agar mineral 1 de Gauze.

Propriedades Bioquímicas - Não produziu melanina; não produziu sulfito de hidrogênio; liquefez a gelatina; não hidrolizou o amido; reduziu nitrato para nitrito; crescimento ligeiro em caldo de celulose de Jensen mas ausência de crescimento em caldo de celulose de Levine e Schoenlein; nenhuma desintegração em ambos os caldos de celulose; coagulação e peptonização em leite; digestão de malato de cálcio negativa; digestão de tirosina positiva; digestão de caseína positiva.

Utilização de açúcares: glucose, ramnose e sacarose são utilizados; arabinose, frutose, inositol, manitol, rafinose e xilose não são utilizados.

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

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

Análise de Células Totais - Os hidrolisados de células totais contem ácido mesodiaminopimélico, galactose, glucose, madurose, ribose e ramnose.

Relações de Temperatura -

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

Actinomadura roseorufa ATCC 53666 é caracterizado pela incapacidade para produzir melanina; micélio substrato rosa, rosa-laranja e laranja a vermelho; e a presença de ácido meso-di-aminopimélico e madurose como componentes de células totais. Apesar de um longo período de incubação até sete semanas, a cultura não produziu esporos apesar das dilatações das hifas terem sido no mesmo meio.

Actinomadura roseorufa ATCC 53666 mostrou-se semelhante a Actinomadura roseorufa Huang ATCC 39,697 (Pedido de Patente Europeia 169 001) na maior parte das características de cultura e em quase todas as propriedades bioquímicas. Em agar de gelatina e em agar de amido, as colónias de ATCC 53666 eram laranja pálido em vez de creme pálido. Em agar de tirosina e agar de Emerson, elas surgiram laranja em vez de castanho. ATCC 53666 ao contrário de A. roseorufa, coagulou o leite. Estas diferenças foram mínimas e portanto a cultura ATCC 53666 é considerada como uma nova estirpe de A. roseorufa.

Também estão dentro do âmbito deste invento outros mutantes, transformantes e recombinantes de mutantes do microorganismo Actinomadura roseorufa o qual tem as características de identificação de ATCC 53666 e os referidos mutantes do referido microorganismo incluem os que têm as características de identificação de ATCC 53869 ou ATCC 53870. Tais outros mutantes podem ocorrer espontaneamente ou serem induzidos através de métodos bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. De modo semelhante,

os transformantes e recombinantes dos microorganismos podem ser obtidos através de uma variedade de técnicas clássicas e de biotecnologia bem conhecidas dos familiarizados com a área. Todos esses outros mutantes, transformantes e recombinantes estão dentro do âmbito deste invento desde que eles produzam um ou ambos os antibióticos CP-91,243 e CP-91,244. Também estão dentro do âmbito deste invento os referidos outros mutantes, transformantes e recombinantes os quais, além de produzirem os antibióticos CP-91,243 e/ou CP-91,244, também produzem UK-58,852 em cultura.

Os novos antibióticos de éteres policíclicos acidicos deste invento são testados quanto à actividade antibacteriana in vitro por métodos convencionais em que é medido as concentrações mínimas inibidoras (MICs) em µg/ml contra um ou mais microorganismos. Um desses processos é o recomendado pela International Collaborative Study on Antibiotic Sensitivity Testing (Ericsson e Sherris, Acta Pathologica et Microbiologia Scandinav, Supp. 217, Section B: 64-68 [1971]), e utiliza agar de infusão de coração e cérebro (BHI) e um sistema de transferência de inóculo. Tubos de crescimento durante a noite foram diluídos 100 vezes para usar como inóculo padrão (20 000-100 000 células em aproximadamente 0,002 ml foram colocadas na superfície de agar; 20 ml de agar BHI/placa). Usou-se doze diluições de 2 vezes da droga a testar com uma diluição inicial de 200 µg/ml. As colónias isoladas são desprezadas quando da leitura das placas após 18 horas a 37°C. A susceptibilidade (MIC) do organismo a testar é aceite como a concentração mais baixa do composto capaz de produzir inibição completa do crescimento observado a olho nu.

Os resultados de eficácia para CP-91,243, CP-91,244 e seus sais contra infecções por coccídeos em galinhas é obtida como se segue. Grupos de 3 pintos brancos de 10 dias de idade não infectados foram alimentados com uma dieta de farelo contendo o

composto a estudar ou o seu sal de sódio e/ou potássio uniformemente disperso. Após estarem com esta ração durante 24 horas cada pinto foi inoculado per os com oocistos da espécie particular de Eimeria a ser testada. Outros grupos de 3 pintos de dez dias de idade foram alimentados com uma dieta de farelo semelhante sem o composto a testar ou os seus sais. Eles foram também infectados após 24 horas e serviram como testemunhas infectadas. Ainda um outro grupo de 3 pintos com dez dias de idade foi alimentado com a mesma dieta de farelo sem antibiótico e não foi infectado com coccídeos. Os resultados dos tratamentos foram avaliados seis dias mais tarde.

Os critérios usados para medir a actividade anticoccidial consistem em pontuações de lesões de 0 a 4 de acordo com J.E. Lynch, «A New Method of the Primary Evaluation of Anticoccidial Activity», Am. J. Vet. Res., 22, 324-326, 1961. A actividade foi medida dividindo a pontuação das lesões de cada grupo tratado pela pontuação de lesões da testemunha infectada.

O valor dos alimentos ingeridos foi de um modo geral determinado directamente alimentando o animal. A Especificação de Patente Britânica Nº 1,197,826 descreve detalhadamente uma técnica de rumen in vitro pela qual as alterações induzidas pelos microorganismos são medidas mais facilmente e com maior precisão na avaliação dos alimentos ingeridos pelos animais. Esta técnica envolve a utilização de um sistema em que os processos digestivos dos animais são conduzidos e estudados in vitro. Os alimentos, inóculo do rumen e vários promotores do crescimento são introduzidos e retirados de uma unidade de laboratório sob condições cuidadosamente controladas e as alterações decorrentes são estudadas criticamente e progressivamente durante o consumo dos alimentos pelo microorganismo. Um aumento no teor de ácido propiónico do fluido do rumen indica que se conseguiu uma

resposta desejável na ruminação global de vida ao promotor de crescimento presente na composição de alimentos. A alteração do teor em ácido propiônico é expressa como percentagem da quantidade de ácido propiônico encontrado no fluido de rumen testemunha. Usaram-se estudos de alimentação in vivo a longo prazo para mostrar uma correlação reprodutível entre o aumento de ácido propiônico no fluido do rumen e a melhoria da produção animal.

O fluido de rumen é colhido de uma vaca fistulada alimentada com ração de engorda comercial mais forragem. O fluido do rumen é imediatamente filtrado através de um pano de queijo e adicionou-se 10 ml a um tubo cônico de 50 ml contendo 400 mg de substrato padrão (68% de amido de milho + 17% de celulose + 15% de farinha de soja extraída), 10 ml de um tampão a pH 6,8 e o composto a testar. Os frascos foram gaseados com azoto sem oxigênio durante cerca de dois minutos e incubados num banho maria com agitação a 39°C durante cerca de 16 horas. Todos os testes foram efectuados em triplicado.

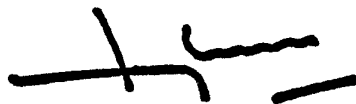
Após incubação, misturou-se 5 ml da amostra com 1 ml de ácido metafosfórico a 25%. Após 10 minutos adicionou-se 0,25 ml de ácido fórmico e a mistura foi centrifugada a 1 500 rpm durante 10 minutos. As amostras foram então analisadas por cromatografia gás-líquido pelo método de D. W. Kellog, J. Dairy Science, 52, 1690, 1969. As alturas dos picos para os ácidos acético, propiônico e butírico foram determinadas para amostras de frascos de incubação não tratados e tratados.

Para usar no tratamento de coccidiose em aves de capoeira, enterite em animais domésticos tais como galinhas, porcos, gado vacum e carneiros e disenteria de suínos, os compostos deste invento são administrados oralmente num veículo adequado. Convenientemente, a medicação é simplesmente deitada



directamente na água de beber, de preferência na forma de um líquido, concentrado solúvel em água (como seja solução aquosa de um sal solúvel em água) ou adicionado directamente nos alimentos, como tal, ou na forma de uma pré-mistura ou concentrado. Para a inclusão do agente nos alimentos normalmente emprega-se uma pré-mistura ou concentrado terapêutico num veículo. Os agentes adequados são líquidos ou sólidos, conforme se deseje, tais como água, várias farinhas; por exemplo farinha de óleo de soja, farinha de óleo de sementes de linho, farinha de tarculo de milho e misturas minerais tais como as normalmente empregues em rações para aves de capoeira. Um veículo particularmente eficaz é o respectivo alimento do animal; ou seja uma pequena porção de tal alimento. Ainda, o micélio pode ser usado como veículo. O veículo facilita a distribuição uniforme dos materiais activos no alimento acabado com o qual a pré-mistura é misturada. Isto é importante porque apenas são necessárias pequenas proporções dos presentes agentes. É importante que o composto seja bem misturado na pré-mistura e subsequentemente no alimento. Relativamente a isto, o agente pode ser disperso ou dissolvido num veículo oleoso adequado como seja óleo de soja, óleo de milho, óleo de sementes de algodoeiro e similares, ou num solvente orgânico volátil e depois misturado com o veículo. É óbvio que as proporções de material activo no concentrado podem sofrer uma larga variação uma vez que a quantidade de agente no alimento acabado pode ser ajustada pela mistura da proporção adequada de pré-mistura com o alimento para se obter o nível pretendido de agente terapêutico.

Os concentrados de elevada potência podem ser misturados pelo fabricante dos alimentos com veículo proteico como seja farinha de óleo de soja e outras farinhas, como descrito atrás, para produzir suplementos concentrados os quais são adequados para alimentação directa de animais. Nestes casos permite-se que os animais consumam a dieta habitual. Como alternativa, tais



- 28 -

suplementos concentrados podem ser adicionados directamente ao alimento para produzir um alimento acabado nutricionalmente equilibrado contendo um nível terapêuticamente eficaz do composto deste invento. As misturas são bem homogenizadas por processos convencionais, como seja num misturador de invólucro duplo para assegurar homogeneidade.

Certamente, será óbvio para os familiarizados com a área que os níveis de utilização do composto aqui descrito variarão de acordo com as circunstâncias. Por exemplo, no tratamento de coccidiose em aves de capoeira, medicação de nível baixo durante o período de crescimento; ou seja durante as primeiras 6 a 12 semanas para as galinhas é uma medida profiláctica eficaz. No tratamento de infecções estabelecidas, podem ser necessários níveis mais elevados para ultrapassar a infecção. O nível usado nos alimentos será de um modo geral na gama de 15 a 120 ppm. Quando administrado na água de beber o nível será o que proporciona a mesma dose diária de medicação, i.e., 15 a 120 ppm, tendo em conta a proporção por peso do consumo médio diário de alimento em relação ao consumo médio diário de água.

Os antibióticos deste invento podem ser administrados como ácido livre ou como seus sais catiónicos. Por exemplo, podem ser empregues os sais de sódio ou potássio dos antibióticos. Tais sais são formados por métodos bem conhecidos dos familiarizados com a área. Os antibióticos CP-91,243 e CP-91,244 podem ser administrados individualmente ou em combinação um com o outro e/ou com UK-58,852. Os antibióticos CP-91,243, CP-91,244 e UK-58,852 podem ser usados na forma bruta ou como caldo de fermentação seco contendo os antibióticos nas concentrações de potência pretendida.

O presente invento é ilustrado pelos exemplos que se seguem. No entanto deverá ser entendido que o invento não está limitado aos detalhes específicos destes exemplos.

EXEMPLO 1

Fermentação de Actinomadura roseorufa FD 28455
(ATCC 53869) e Recuperação dos Antibióticos

A. Preparação do Inóculo

Preparou-se um meio aquoso tendo a composição que se segue.

<u>Ingrediente</u>	<u>Gramas/Litro</u>
Cerelese	10,0
Amido de Milho	5,0
Melaço de Milho	5,0
NZ Amine YTT*	5,0
Cloreto de Cobalto	0,002

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

Após o pH ter sido ajustado a 7,0, o meio foi distribuído (500 ml) por frascos Fernbach de 2 800 ml, tendo rolha de algodão protegida por papel e esterilizado por autoclavagem durante 60 minutos a 121°C (15 p.s.i.g). Após arrefecimento, o meio foi inoculado com uma suspensão de células vegetativas a partir de uma rampa de FD 28455. Os frascos foram agitados a 28°C num agitador rotativo tendo um deslocamento de 1,5 a 2,5 polegadas e 150 a 200 ciclos por minuto durante 6 dias.

B. Fermentação e Isolamento de
CP-91,243 , CP-91,243 e UK-58,852

Um frasco de Fernbach contendo 800 ml da cultura crescida foi usado para inocular um vaso de fermentação de 14 litros contendo 8 litros de meio estéril ao qual foi adicionado 4 ml de um agente anti-espumante de silicone tendo a seguinte composição:

<u>Ingrediente</u>	<u>Gramas/Litro</u>
Cerelese	55,0
Farinha de Soja	10,0
Melaço de Milho	15,0
Farinha de Sangue	10,0
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 arejamento a 0,75 volume de ar por volume de caldo por minuto até se produzir actividade substancial. O CP-91,243/CP-91,244/UK-58,852 no caldo e as recuperações foram visualizadas usando placas de cromatografia de camada fina em sílica gel desenvolvidas com um sistema consistindo em 9:1 clorofórmio :metanol. As placas foram vaporizadas com reagente de vanilina (6 g de vanilina em 100 ml de etanol e 3% de ácido sulfúrico concentrado) e aquecidas a 100°C durante 5 minutos. Os antibióticos surgiram como manchas azul avermelhado. Como alternativa a placa é coberta com agar semeado com B. subtilis, ao qual foi adicionada uma solução de 0,4 ml de uma solução a 5% de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio e incubada a 37°C durante



- 31 -

16 horas para visualizar os antibióticos como áreas incolores contra um fundo vermelho.

Todo o caldo (15 litros) obtido por combinação dos caldos de fermentação de dois fermentadores de 14 litros foi agitado durante 20 minutos com um volume igual de metilisobutilcetona. As fases aquosa e de solvente foram separadas, a fase aquosa foi rejeitada e o solvente foi concentrado para dar um óleo (24 g). Este concentrado foi cromatografado numa coluna de 700g de sílica gel (70-230 mesh, Universal Absorbents) numa coluna de vidro de 5,5 cm x 8 cm usando clorofórmio:metanol (19:1) como eluato. O fluxo foi de 10 ml/minuto e colheu-se uma fracção por minuto. Estas fracções foram examinadas por cromatografia em camada fina (placas de sílica gel GF Analtech), desenvolvidas num sistema de clorofórmio:metanol (9:1) e visualizadas por vaporização/aquecimento com reagente de vanilina como descrito atrás. As fracções contendo principalmente CP-91,243, CP-91,244 ou UK-58,852 foram combinadas por antibiótico e concentradas para dar 0,7 g de CP-91,243, 4,9 g de CP-91,244 e 3,6 g de UK-58,852.

O concentrado contendo CP-91,244 foi novamente cromatografado numa coluna de 200 g de sílica gel (70-230 mesh, Universal Absorbents) numa coluna de vidro de 2,5 cm x 100 cm usando acetato de etilo como eluato. O fluxo foi de 10 ml/min e colhida uma fracção por minuto. As fracções foram analisadas por cromatografia em camada fina como descrito atrás e as fracções enriquecidas em CP-91,244 foram combinadas, concentradas e cristalizadas a partir de acetato de etilo para dar 850 mg de CP-91,244.

As fracções com CP-91,243 e UK-58,852 foram cromatografadas do mesmo modo para dar 280 mg de CP-91,243 que cristalizou

a partir de acetato de etilo e 1,5 g de UK-58,852 que foi cristalizado a partir de hexano.

As análises estruturais para CP-91,243 e CP-91,244 foram então feitas com base em C-13NMR, análise elemental e FAB/MS dos sais de sódio dos antibióticos por comparação com os antibióticos conhecidos UK-58,852 e UK-61,689.

CP-91,243 deu o seguinte: mp 178-180°C, $[\alpha]_D^{25} = -7,6^\circ$ (c=1, CH₃OH) e FAB/MS 996 (M+Na)⁺;

Anal. Calc. para C₅₀H₈₃O₁₈NaH₂O:

C, 59,22; H, 8,47

Encontrado

C, 59,22; H, 8,23.

C-13 nmr [desvio químico(ppm) em CDCl₃ (com duas descidas CD₃OD) com o número de hidrogénios entre parêntesis]:

179,3 (0), 107,6(0), 103,3(1), 102,5(1), 98,0(0), 97,0(0), 87,1(1), 84,8(0), 84,3(0), 82,6(1), 82,4(1), 81,8(1), 81,0(1), 80,2(1), 76,0(1), 75,8(1), 73,4(1), 71,4(1), 70,9(1), 70,2(1), 67,9(1), 67,6(1), 59,6(3), 45,4(2), 44,7(1), 39,9(1), 39,0(2), 36,6(2), 33,8(1), 33,8(2), 33,5(1), 33,5(2), 33,1(1), 32,5(2), 32,5(2), 32,3(2), 32,3(2), 31,4(2), 31,0(2), 27,5(3), 26,9(2), 26,1(3), 23,2(3), 18,1(3), 17,9(3), 17,4(3), 16,8(3), 12,3(3), 10,9(3) e 10,3(3).

CP-91,244 deu o seguinte: mp 154-157°C, $[\alpha]_D^{25} = -4,8^\circ$ (c=1, CH₃OH) e FAB/MS 1010 (M+Na)⁺;

Anal. Calc. para C₅₁H₈₅O₁₈Na: C, 60,65; H, 8,59

Encontrado:

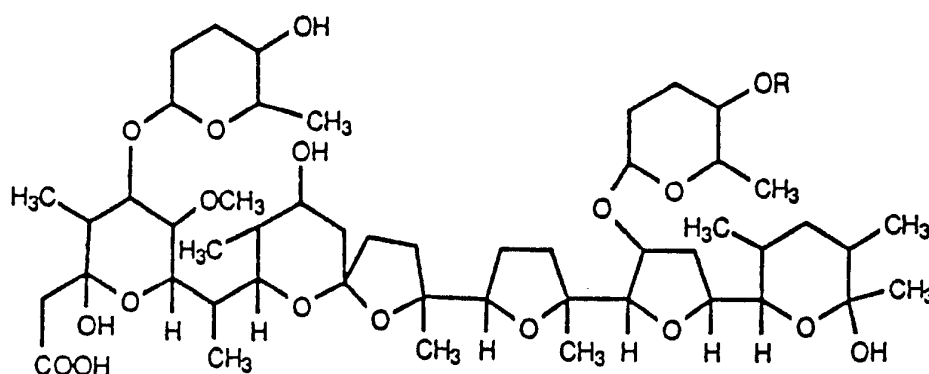
C, 60,41; H, 8,58.

[Handwritten signature]

- 33 -

C-13 nmr [desvio químico (ppm) em CDCl₃ com o número de hidrogênios entre parêntesis]: 179,3(0), 107,6(0), 103,2(1), 102,5(1), 98,0(0), 97,0(0), 87,1(1), 84,7(0), 84,3(0), 82,5(1), 82,4(1), 81,8(1), 80,9(1), 80,3(1), 80,0(1), 75,8(1), 74,7(1), 73,1(1), 71,7(1), 70,2(1), 67,8(1), 67,5(1), 59,6(3), 56,8(3), 45,7(2), 44,8(1), 40,0(1), 39,0(2), 36,6(2), 33,9(2), 33,7(1), 33,6(1), 33,6(2), 33,2(1), 32,6(2), 32,4(2), 31,7(2), 31,5(2), 30,7(2), 27,7(3), 27,0(2), 26,9(2), 26,1(3), 23,3(3), 18,4(3), 18,1(3), 17,5(3), 17,0(3), 12,4(3), 11,1(3) e 10,4(3).

Assim, a CP-91,243 e CP-91,244 foi atribuída a fórmula estrutural



onde R é H em CP-91,243 e R é CH₃ em CP-91,244.

EXEMPLO 2

Fermentação de Actinomadura roseorufa FD 28518
(ATCC 53870) e Recuperação dos Antibióticos

Seguindo o processo descrito no Exemplo 1, Actinomadura roseorufa ATCC 53870 foi fermentada, o caldo (15 litros) foi extraído e a fase de solvente foi concentrada para dar um óleo (17 g). O concentrado foi cromatografado de acordo com o processo

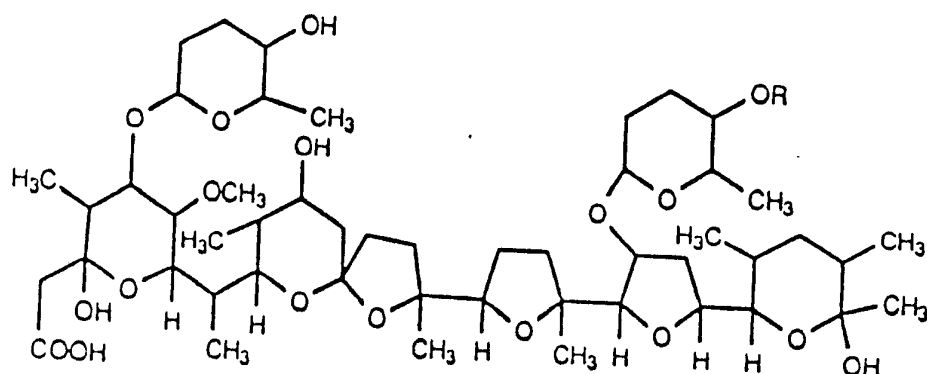


- 34 -

descrito no Exemplo 1. As fracções contendo principalmente CP-91,243, CP-91,244 ou UK-58,852 foram combinadas por antibiótico e concentradas para dar 5 g de CP-91,243, 3,5 g de CP-91,244 e 2,5 g de UK-58,852. Os concentrados foram ainda cromatografados e cristalizados de acordo com o processo descrito no Exemplo 1 para os concentrados ali tratados para dar 1,2 g de CP-91,243, 480 mg de CP-91,244 e 190 mg de UK-58,852.

REIVINDICAÇÕES

12. - Processo para a produção de um antibiótico da fórmula:

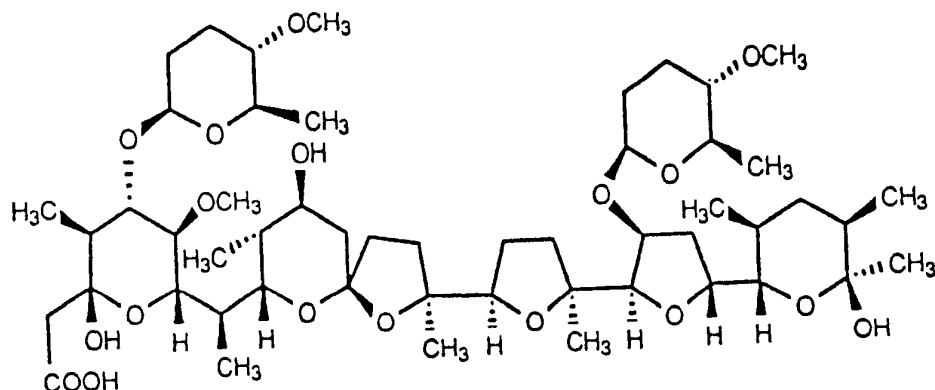


e os seus sais catiónicos farmacêuticamente aceitáveis em que R é H ou CH₃, caracterizado por compreender a fermentação, num meio nutritivo aquoso contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos em condições de fermentação aeróbia submersa, de um mutante do microorganismo Actinomadura roseorufa, tendo o referido microorganismo as características de identificação da AfCC 53666, ou de um outro seu mutante, transformante ou recombinante, sendo o referido mutante, outro mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir o referido antibiótico.

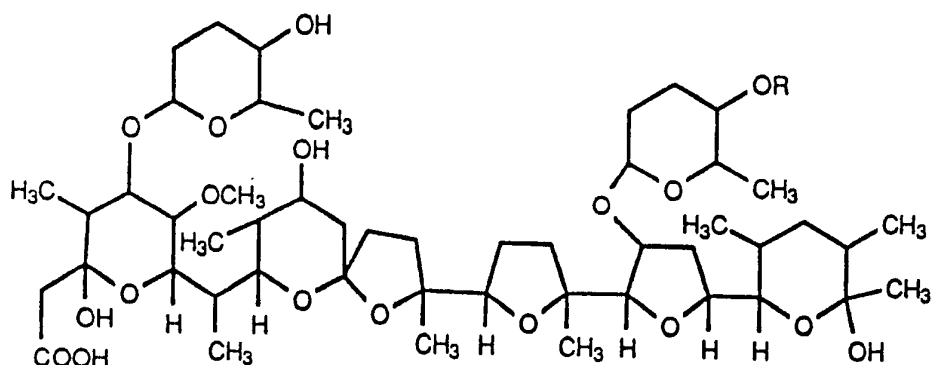
22. - Processo para a produção de antibióticos da fórmula

[Handwritten signature]

- 36 -



®

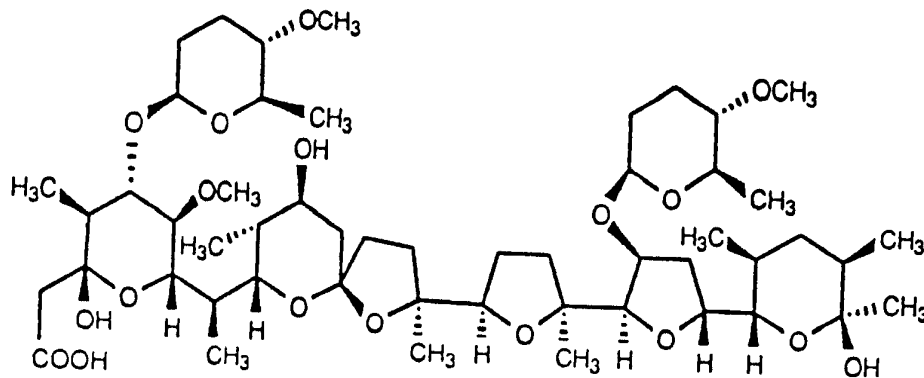


em que R é H e/ou CH₃ que se caracterizado por compreender a fermentação, num meio nutritivo aquoso contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos em condições de fermentação aeróbia submersa, de um mutante do microorganismo Actinomyces roseorufa, tendo o referido microorganismo as características de identificação da ATCC 53666, ou de um outro seu mutante, transformante ou recombinante, sendo o referido mutante, outro mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir os referidos antibióticos.

3a. - Processo para a produção de um antibiótico da fórmula



- 37 -



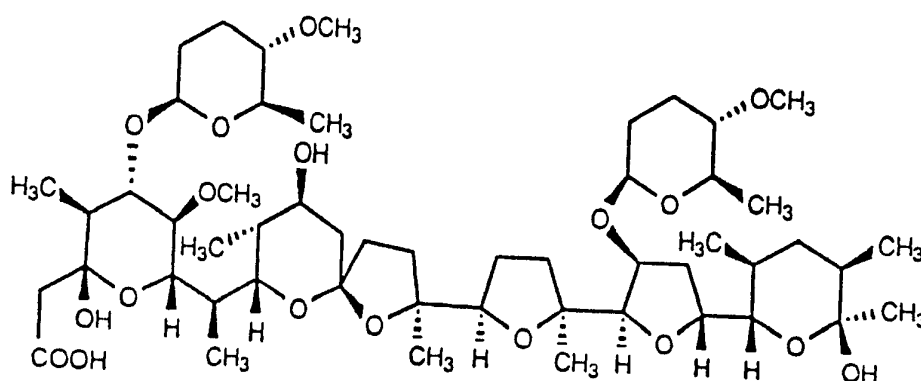
caracteriza por compreender a fermentação, num meio nutritivo aquoso contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos em condições de fermentação aeróbia submersa, de um mutante do microorganismo Actinomadura roseofura, tendo o referido microorganismo as características de identificação da ATCC 53565, ou de um outro seu mutante, transformante ou recombinante, sendo o referido mutante, outro mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir o referido antibiótico.

42. - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado por se proceder à fermentação de Actinomadura roseorufa tendo as características de identificação da ATCC 53859 ou ATCC 53870, ou de um seu mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir, através de cultura, o referido antibiótico.

52. - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 ou 4, caracterizado por compreender ainda o isolamento do referido antibiótico.

62. - Mutante do microorganismo Actinomadura roseorufa, caracterizado por o referido microorganismo ter as características de identificação da ATCC 53565 ou de um outro seu mutante, transformante ou recombinante, sendo o referido mutante, outro

mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir, através de cultura, um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 ou um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e um antibiótico da fórmula



72. - Actinomadura roseofura de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por ter as características de identificação de AfCC 53869 ou AfCC 53870, ou de um seu mutante, transformante ou recombinante, sendo a referida Actinomadura roseofura ou seu mutante, transformante ou recombinante capaz de produzir, através de cultura, um antibiótico de acordo com a reivindicação 1.

82. - Método para o controle de infecções coccídicas em aves de capoeira, caracterizado por compreender a administração, às referidas aves, de uma quantidade anticoccidicamente eficaz, de cerca de 15 a cerca de 120 ppm, baseado na quantidade total de ração, de:

(a) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1; ou

(b) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1; ou

- (c) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e com UK-58 852; ou
- (d) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1 e UK-58 852.

9a. - Processo para a preparação uma composição de ração nutriente para aves de capoeira, caracterizado por se incluir na referida composição:

- (a) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1; ou
- (b) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1; ou
- (c) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e com UK-58 852; ou
- (d) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1 e UK-58 852.

numa quantidade eficaz para controlar infecções por coccídios nas referidas aves de capoeira.

10a. - Método para o tratamento de enterite em animais domésticos, caracterizado por compreender a administração, aos referidos animais domésticos, de uma quantidade que trate a enterite, de cerca de 15 a cerca de 120 ppm, baseado na quantidade total de ração, de:

- (a) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1; ou
- (b) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1; ou

- (c) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e com UK-58 852; ou
- (d) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1 e UK-58 852.

112. - Processo para a preparação de uma composição de ração nutriente para animais domésticos, caracterizado por se incluir na referida composição:

- (a) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1; ou
- (b) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1; ou
- (c) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e com UK-58 852; ou
- (d) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1 e UK-58 852.

numa quantidade eficaz para tratar enterite nos referidos animais domésticos.

122. - Método para o tratamento de disenteria em suínos, caracterizado por compreender a administração ao suíno, de cerca de 15 a cerca de 120 ppm, baseado na quantidade total de ração, de:

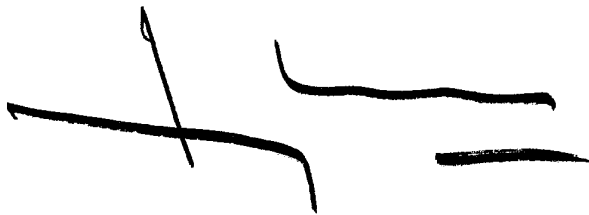
- (a) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1; ou
- (b) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1; ou

- (c) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e com UK-58 852; ou
- (d) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1 e UK-58 852.

132. Método para promover o crescimento e/ou melhorar a eficácia de utilização de alimentos num animal ruminante ou monogástrico, caracterizado por compreender a administração ao referido animal de uma quantidade que promova o crescimento e/ou melhore a eficácia da utilização de alimentos, de cerca de 15 a cerca de 120 ppm, baseado na quantidade total de ração, de:

- (a) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1; ou
- (b) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1; ou
- (c) um antibiótico de acordo com a reivindicação 1 e com UK-58 852; ou
- (d) os antibióticos de acordo com a reivindicação 1 e UK-58 852.

Lisboa, 30 de Maio de 1990


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