

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96 564

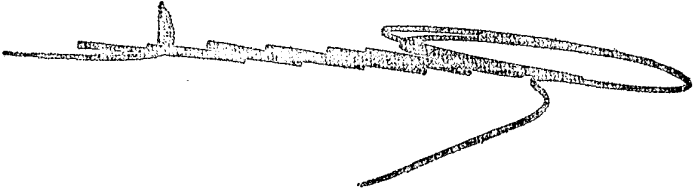
REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede
em D-6230 Frankfurt am Main, República Federal
Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE UM NOVO ANTIBIÓTICO,
DESOXIMULUNDOCANDINA, E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊU-
TICAS QUE O CONTÊM"

INVENTORES: Dr Kirty Roy, Dr. Triptikumar Mukhopadhyay,
Dr. Hans-Wolfram Fehlhaber, Dr. Herbert Kog-
ler e Dr. Binal Naresh Ganguli

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

Europeia, em 26 de Janeiro de 1990, sob o N.º. 90 101 538.8.

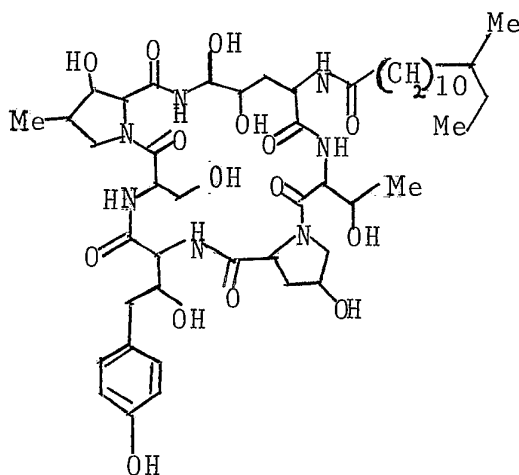


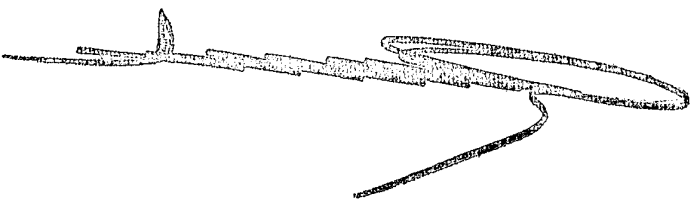
Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGES-
ELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Kirity Roy, Dr. TriptiKumar MuKhopadhyay, residentes na Índia, e Dr. Hans-Wolfram Fehlhaber e Dr. Herbert Kogler, residentes na República Federal Alemã e Dr. Binal Naresh Ganguli, residente na Índia), para "PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE UM NOVO ANTIBIÓTICO, DESOXIMULUNDOCANDINA, E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

D E S C R I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a um novo antibiótico, desoximulundocandina, um processo para a sua preparação e à sua utilização como medicamento.

O antibiótico desoximulundocandina que tem a seguinte fórmula:



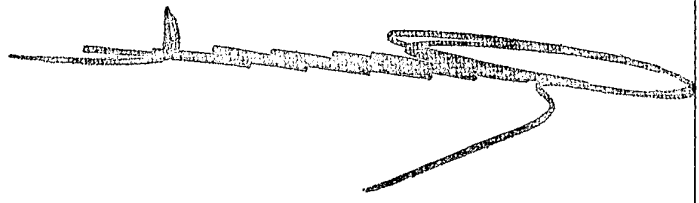


faz parte dos antibióticos do tipo da equinocandina, mas é ao mesmo tempo diferente dos antibióticos conhecidos do tipo da equinocandina pelas razões abaixo indicadas. Os antibióticos do tipo da equinocandina são descritos no "CRC Handbook of Antibiotic Compounds", Vol. IV, parte I, Amino Acido and Peptide Antibiotics, págs. 355-368, Janos Berdy (autor), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, 1980. Recentemente, foram descritos antibióticos similares in J. Antibiotics 42, 163-167 (1989) e J. Antibiotics 42, 168-173 (1989).

A presente invenção refere-se também aos equivalentes químicos óbvios e derivados farmacêuticamente aceitáveis da desoximulundocandina. A preparação de tais derivados é conhecida para os antibióticos do tipo da equinocandina.

Os antibióticos do tipo da equinocandina são produzidos por numerosos micro-organismos pertencentes à ordem das Moniliales e à família das Moniliáceas, por exemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus rugulosos*, *Aspergillus aculeatos*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans-echinulatus*, *Aspergillus sydowii* (Bainier e Sartory) Thom e Church var. nov. *mulundensis* Roy (descritos na Patente indiana Nº. 162032, datada de 3 de Fevereiro de 1986) ou *Acrophilophora luminispora*. Os antibióticos do tipo da equinocandina contêm um peptídeo natural com uma cadeia lateral de ácido gordo. A parte peptídica consiste de treonina, serina, hidróxi-prolina e certos aminoácidos pouco vulgares. A constituinte de ácido gordo pode ser ácido lino-léico, mirístico ou palmítico. Os antibióticos do tipo da equinocandina possuem uma característica absorção nos UV, a 225-226 e 276-278 nm, possuem actividades anti-leveduras e anti-fúngica, e apresentam normal acidez reduzida.

Outro objectivo da presente invenção consiste em fornecer um processo para a produção de um novo antibiótico, desóxi-mulundocandina com a estrutura apresentada na fórmula I, por *Aspergillus sydowii* (Bainier e Sartory)

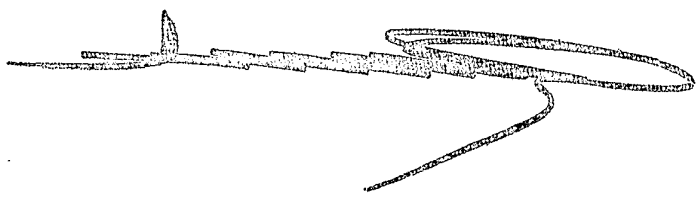


Thom e Church var. nov. mulundensis Roy (cultura Nº Y-30462) (descrito na Patente indiana Nº. 162032, datada de 3 de Fevereiro de 1986). O referido micro-organismo foi depositado em 15 de Janeiro de 1990, de acordo com as condições do tratado de Budapeste com a "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen", Braunschweig (DSM 5745).

De acordo com a presente invenção, apresenta-se um processo para a produção de um novo antibiótico, desóxi-mulundocadina com a estrutura acima apresentada, por *Aspergillus sydowii* (Brainier e Sartory) Thom e Church var. nov. mulundensis Roy (cultura Nº. Y-30462) (micro-organismo descrito na Patente indiana Nº. 162032, datada de 3 de Fevereiro de 1986), caracterizado por se cultivar o referido micro-organismo por fermentação em condições aeróbicas num meio nutriente contendo fontes de carbono tais como glucose ou amido, fontes de azoto tais como extracto de carne, triptona ou extracto de levedura, e sais inorgânicos tais como os de sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, zinco, cobalto, manganês, cobre, fósforo, ou enxofre, a uma temperatura entre 25-30°C e a pH 6-7, e se isolar e purificar o referido antibiótico do caldo de cultura pelos processos conhecidos.

Se desejado, a fermentação da cultura Nº Y-30462 é realizada na presença de um agente contra a formação de espuma, tal como Desmophen^R (um poliéter linear com base em propileno-óxido, Bayer AG, Leverkusen, Alemanha). De preferência, a fermentação da cultura Nº Y-30462 é realizada a aprox. 26°C e pH aprox. 6.5. A fermentação da cultura Nº Y-30462 é realizada de preferência em condições de submersão e travada às 66-80 horas. O novo antibiótico no caldo de cultura e micela é detectado pela sua actividade testada contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, pelo método de ensaio padronizado da difusão sobre placas de agar-agar (Assay Method of Antibiotics, a laboratory manual, 1955, por Grove, D.C. e Randall, W.A., Medical Encyclopedia Inc., New York).

Os exemplos seguintes ilustram a presente invenção:



EXEMPLO I

Cultivo da cultura Y-30462 em balões agitados para a produção fermentativa do antibiótico desoxi-mulundocandina

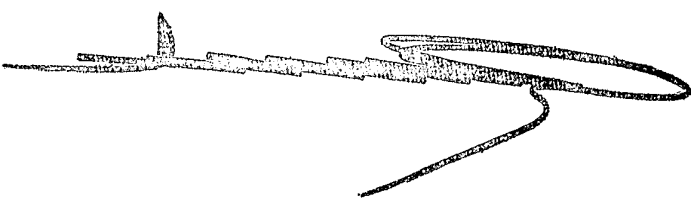
Composições do meio de cultura para a cultura de sementeira:

Farinha de soja	20.0g
Glucose	30.0g
Carbonato de cálcio	6.0g
Cloreto de sódio	3.0g
Cloreto de amônia	2.5 g
Bifosfato de potássio	2.0g
Água desmineralizada	1.0 litro

O meio de cultura acima descrito foi distribuído por balões de Erlenmayer de 100 ml e boca larga, e esterilizado a 121°C durante 20 minutos. O pH antes de esterilização no autoclave era de 6.5. Os balões foram arrefecidos e inoculados com algumas ilhós cheias de uma cultura de Y-30462 bem esporulada, e agitados a 240 rpm durante 60 horas a 26°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Esta cultura foi utilizada como cultura de sementeira para inocular o meio de produção do antibiótico.

Composição do meio de produção do antibiótico:

Extracto de carne	3.0g
Tryptona	5.0g
Glucose	10.0g
Amido solúvel	24.0g
Extracto de levedura	5.0g
Carbonato de cálcio	4.0g
Cloreto de manganês tetrahidratado	0.5mg
sulfato de zinco heptahidratado	0.22mg
Cloreto de cálcio	0.55 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	0.5 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	0.16mg
Cloreto de cobalto hexahidratado	0.16mg
Água desmineralizada	1.0 litro



O meio de produção do antibiótico acima descrito foi distribuído por balões de Erlenmayer de 1 litro e boca larga, e esterilizado a 121°C durante 20 minutos. O pH antes da esterilização no autoclave era de 6.5. Os balões foram arrefecidos e inoculados com a cultura de sementeira (1% v/v). A fermentação foi realizada em agitador rotativo, 26°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 76 horas. Depois da colheita, o líquido de cultura foi cetrifugado e o novo antibiótico foi isolado tanto das micelas como do filtrado conforme descrito no Exemplo II.

EXEMPLO II

Cultivo da cultura Y-30462 em fermentadores para a produção do antibiótico desoxi-mulundocandina.

Fase 1: Preparação da cultura de sementeira

a) Em balões agitados

O meio de cultura para a cultura de sementeira (conforme descrito no exemplo I) foi colocado em tomas de 100 ml, em balões de Erlenmayer de 500 ml e boca larga, com um pH de 6.5 acertado antes da esterilização. Estes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos, arrefecidos e inoculados com esporos da cultura Y-30462. Os balões foram incubados a 26°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 48 horas, em agitador rotativo a 240 rpm.

b) Em frascos aspiradores

Num frasco aspirador de 5 litros colocou-se 1 litro de meio de cultura para a cultura de sementeira (conforme descrito no Exemplo I), com 0,4 ml de Desmophen como agente anti-espuma. O frasco foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 30 minutos, arrefecido e inoculado com esporos da cultura Y-30462. Os frascos foram montados num agitador rotativo e incubados a 26°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 48 horas, a 240 rpm.

Fase 2: Fermentação

a) Em pequena escala

Esterilizaram-se num autoclave a 121°C durante 36 minutos, 10 litros de meio de cultura para a produção (conforme descrito no Exemplo I), com pH ajustado a 6.5 antes da esterilização, e 4 ml de Desmophen como agente anti-espuma, num fermentador de aço inoxidável de 15 litros, arrefeceu-se em banho de água e sob pressão de ar esterilizado, e procedeu-se à sementeira com 1% de cultura de sementeira em condições assépticas.

Estas foram estabelecidas de acordo com os seguintes parâmetros:

Temperatura	26-27°C
Arejamento	1:0.6 a 0.8 vol/vol.de meio 6-8 litros por minuto
Agitação	160 rpm
Tempo de fermentação	66 horas

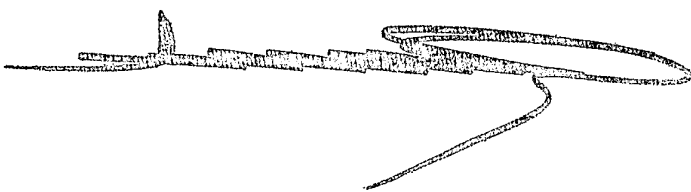
b) Em larga escala

Esterilizaram-se insitu a 121°C durante 32 minutos, 95 litros de meio de cultura para a produção (conforme descrito no Exemplo I), com pH ajustado a 6.5 antes da esterilização, e 40 ml de Desmophen, num fermentador de 150 litros, ou 270 litros de meio de produção e 75 ml de Desmophen num fermentador de 390 litros, e procedeu-se à sementeira com 1% de cultura de sementeira em condições assépticas.

Volume semeado:	110 litros num fermentador de 150 l 280 litros num fermentador de 390 l
-----------------	--

Aquelas condições foram estabelecidas de acordo com os seguintes parâmetros:

Temperatura	26-27°C
Arejamento	1:0.6 a 0.8 vol/vol. de meio
para 110 litros:	60 - 80 lpm
para 280 litros:	160 - 224 lpm (9 a 13 nm ³ /h)
Agitação	100 - 110 rpm
Tempo de fermentação	66 horas



O caldo de cultura foi centrifugado para separar as micelas do filtrado da cultura e depois processado.

Fase 3: Isolamento de desoxi-mulundocandina

Misturaram-se dois caldos de cultura - um do fermentador de 150 litros e outro do fermentador de 390 litros - e centrifugaram-se para separar o filtrado da cultura das micelas (33.5 Kg).

O filtrado da cultura (337 litros) foi extraído uma vez com acetato de etilo (245 litros). As micelas (33.5 Kg) foram extraídas com acetona (2 x 100 litros) e o extracto foi concentrado a 38°C sob pressão reduzida (<100 Torr), até 60 litros. O concentrado foi diluído com 60 litros de água e extraído com acetato de etilo (4 x 60 litros). Fez-se uma pool com este extracto e o extracto do filtrado da cultura. Os extractos de acetato de etilo combinados foram concentrados a 38°C sob pressão reduzida (<100 Torr), de modo a obter a preparação bruta do antibiótico, sob a forma de um óleo (235 g). Este foi triturado com acetonitrilo (3 x 5 litros) e centrifugado. A solução límpida foi rejeitada, e o resíduo sólido foi tratado com metanol (2 x 1 litro). Após a centrifugação, a solução metanólica foi concentrada de modo a obter o composto semi-puro (6 g).

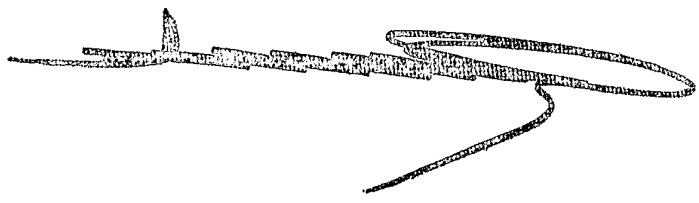
Este composto foi absorvido sobre silicagel com um grau de pureza para cromatografia em camada fina (CCF) e depois vazado numa soluna (3 cm x 85 cm) cheia com silicagel com um grau de pureza para CCF (350 g). A coluna, embebida com acetato de etilo, foi eluída sob pressão com acetato de etilo: n-propanol (5:3), a uma taxa de fluxo de 20 ml/minuto. A desóxi-mulundo-candina é eluída em primeiro lugar, seguida de mulundocandina e de outros compostos bio-activos. A pureza das fracções foi controlada por CCF (silicagel; solvente de eluição: acetato de etilo:n-propanol: água (5:3:1); detecção com vapor de iodo), e as fracções contendo apenas desóxi-mulundocandina foram combinadas. Depois de eliminar o solvente sob pressão reduzida, obteve-se o

composto puro (85 mg).

Combinaram-se as outras fracções contendo misturas de desóxi-mulundocandina e mulundocandina. A eliminação do solvente sob pressão reduzida forneceu desóxi-mulundocandina impura (440 mg).

Propriedades físico-químicas do novo antibiótico desóxi-mulundocandina

- | | | |
|---|---|------------------------------|
| 1. Aspecto: | pó branco, amorfo | |
| 2. Ponto de fusão: | 167-168°C | |
| 3. Solubilidade: | solúvel em metanol, dimetilformamida, dimetil-sulfóxido, pouco solúvel em água, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, tetracloreto de carbono, clorofórmio, benzeno, éter de pretróleo | |
| 4. Reacções coradas: | Spray reagente | Cor |
| (composto sobre a placa de silicagel e vaporizado) | KMnO ₄ | branco sobre fundo rosa |
| | FeCl ₃ /K ₃ Fe(CN) ₆ | azul sobre fundo verde claro |
| | Ninhidrina | sem cor característica |
| | Pauley's | sem cor característica |
| | Ehrlich | sem cor característica |
| | Âc. benzidino- | sem cor característica |
| 5. $[\alpha]_D^{25}$ | -28.23° (c, 0.25, metanol) | |
| 6. CCF (sobre placa de silicagel de E.Merck, Ref ^a 5554) | Sistema eluente | Rf |
| | EtOAc:n-PrOH:H ₂ O (5:3:1) | 0.76 |
| | BuOH:AcOH:H ₂ O (4:1:1) | 0.71 |


CHCl₃:MeOH:17% 0.58
amônia aquosa (2:1:1)
Camada inferior

7. Cromatografia líquida de alta pressão Tempo de retenção
Coluna prévia 10 u ODS Hypersil 9.2 min
(3 cm x 0.4 cm)

Coluna 10 u ODS Hypersil
(25 cm x 0.4 cm)

Eluente MeOH:0.2% NaH₂PO₄, 2H₂O em
água:H₃PO₄ (75:25:0.1)

Fluxo 2 ml/min

8. Fórmula molecular: C₄₈H₇₇N₇O₁₅ (992.2)

9. Peso molecular: confirmado por FAB-MS (matrix
álcool 3-nitro-benzílico + iodeto
de lítio); M+Li obtido m/z
998.55, calculado 998.562
(¹²C₄₈ ¹H₇₇ ¹⁴N₇ ¹⁶O₁₅ ⁷Li).

10. Espectro de UV: λ max (E₁¹ %
cm)

a) em MeOH 225 (74), 276 (16.5), 282 sh
(13.5) nm

b) em MeOH/NaOH: 224 (72.5), 241 sh (37.5), 277
(50 uL de NaOH 0.1N (15), 282 (14.5), 294 (8) nm
adicionados a 3 mL
de solução de MeOH)

11. Espectro de IV (KBr): ver Figura 1 dos gráficos que
acompanham as especificações

12. Espectro de ¹H-RMN 400 MHz: ver figura 2 dos gráficos
acompanham as especifica-
ções

13. Composições de aminoácidos: 4-hidróxi-prolina, serina,
treonina, 3-hidróxi-4-
-metil-prolina, 4,5-dihi-
dróxi-ornitina e 3-hidróxi-
homotirosina

14. Composições de ácidos gordos: ácido 12-metil-tetradecanóico

Assim, o novo antibiótico desóxi-mulundocandina contém um componente de ácido gordo. Este ácido gordo encontra-se apenas na mulundocandina e não noutros antibióticos do tipo da desóximulundocandina é diferente da da mulundocandina. A desóximulundocandina contém 3-hidróxi-homotirosina e não 3,4-dihi-dróxi-homotirosina, que se encontra presente na mulundocandina. Conforme se verifica pelas propriedades físico-químicas e pela estrutura, o novo antibiótico desóxi-mulundocandina é totalmente diferente de qualquer dos outros antibióticos do tipo da equinocandina conhecidos.

Verificou-se que o novo antibiótico desóxi-mulundocandina possui propriedades anti-leveduras, anti-fúngicas e imuno-moduladoras. As concentrações inibidoras mínimas que se determinou serem necessárias para inibir as diferentes estirpes de leveduras e fungos foram as indicadas na Tabela I.

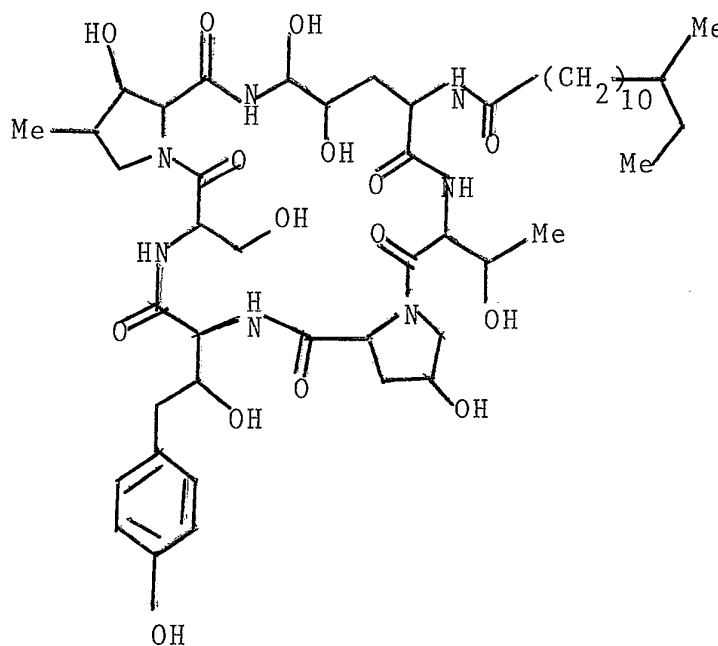
Organismos testados	Concentração inibidora mínima do novo antibiótico desóxi-mulundocandina
<i>Candida albicans</i>	1.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.1
<i>Aspergillus niger</i>	3.1
<i>Penicillium italicum</i>	25
<i>Cladosporium species</i>	0.75
<i>Cercospora betícola</i> 71	6.25
<i>Botrytis cinerea</i> 47	6.25
<i>Botrytis cinerea</i> 57	50
<i>Botrytis cinerea</i> 211	25
<i>Botrytis cinerea</i> 212	25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	< 0.18
<i>Microsporum gypseum</i>	0.18
<i>Microsporum canis</i>	< 0.18

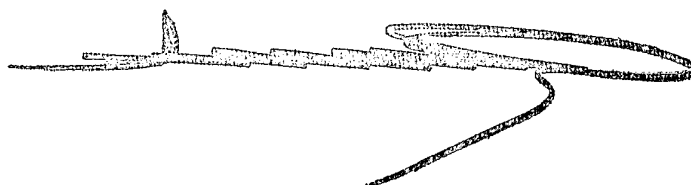
Desta forma, a presente invenção refere-se também a composições farmacêuticas que contenham o composto da fórmula I ou seus derivados farmacêuticamente aceitáveis, se necessário em conjunto com os adjuvantes e/ou excipientes usuais. Para além disso, a presente invenção refere-se à utilização do composto da fórmula I ou dos seus derivados farmacêuticamente aceitáveis para a produção de composições farmacêuticas; os pormenores dessa produção são conhecidos da literatura referente aos antibióticos do tipo da equinocandina.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para preparação de desoximulundocandina, um composto com a fórmula





bem como dos equivalentes químicos óbvios e derivados fisiologicamente toleráveis, caracterizado por se cultivar *Aspergillus sydowii* Y-30462 (DSM 5745) em condições aeróbicas, num meio nutriente que contenha fontes de carbono, fontes de azoto e sais inorgânicos.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a cultura se realizar a uma temperatura entre 25 e 30°C.

- 3ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado por a cultura se realizar a um pH entre 6 e 7.

- 4ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado por a cultura se realizar a uma temperatura de aprox. 26°C e um pH de aprox. 6.5.

- 5ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 4, caracterizado por a cultura de realizar durante mais de 66 horas.

- 6ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 5, caracterizado por a cultura se realizar sob a forma de cultura submersa.

- 7ª -

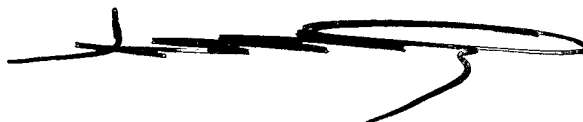
Processo para preparação de uma composição farmacêutica, com acção anti-leveduras, anti-fúngica

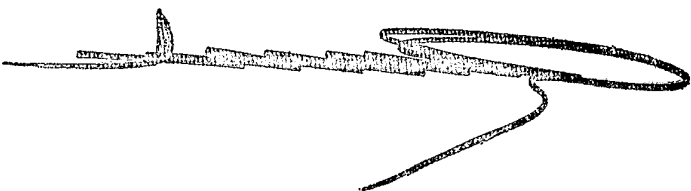
e/ou imuno-moduladora, caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um composto quando produzido de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 6, em conjunto com os adjuvantes e/ou excipientes usuais, numa formulação galénica para administração.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente apresentado na Patente Europeia em 26 de Janeiro de 1990, sob o Nº 90 101 538.8.

Lisboa, 24 de Janeiro de 1991.

O AGENTE GERAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

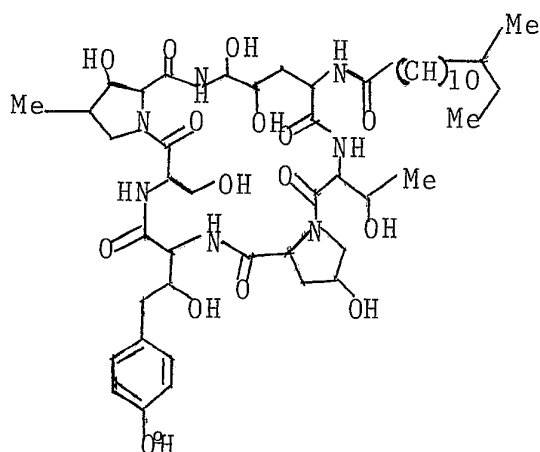
A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned below the typed text of the agent's name.



R E S U M O

" PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE UM NOVO ANTIBIÓTICO, DESOXIMULUNDO CANDINA, E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE O CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para preparação de desoximulundocandina, um composto com a fórmula



bem como dos seus equivalentes químicos óbvios e derivados fisiologicamente toleráveis, que compreende cultivar-se *Aspergillus sydowii* Y-30462 (DSM 5745) em condições aeróbicas, num meio nutriente que contenha fontes de carbono, fontes de azoto e sais inorgânicos.

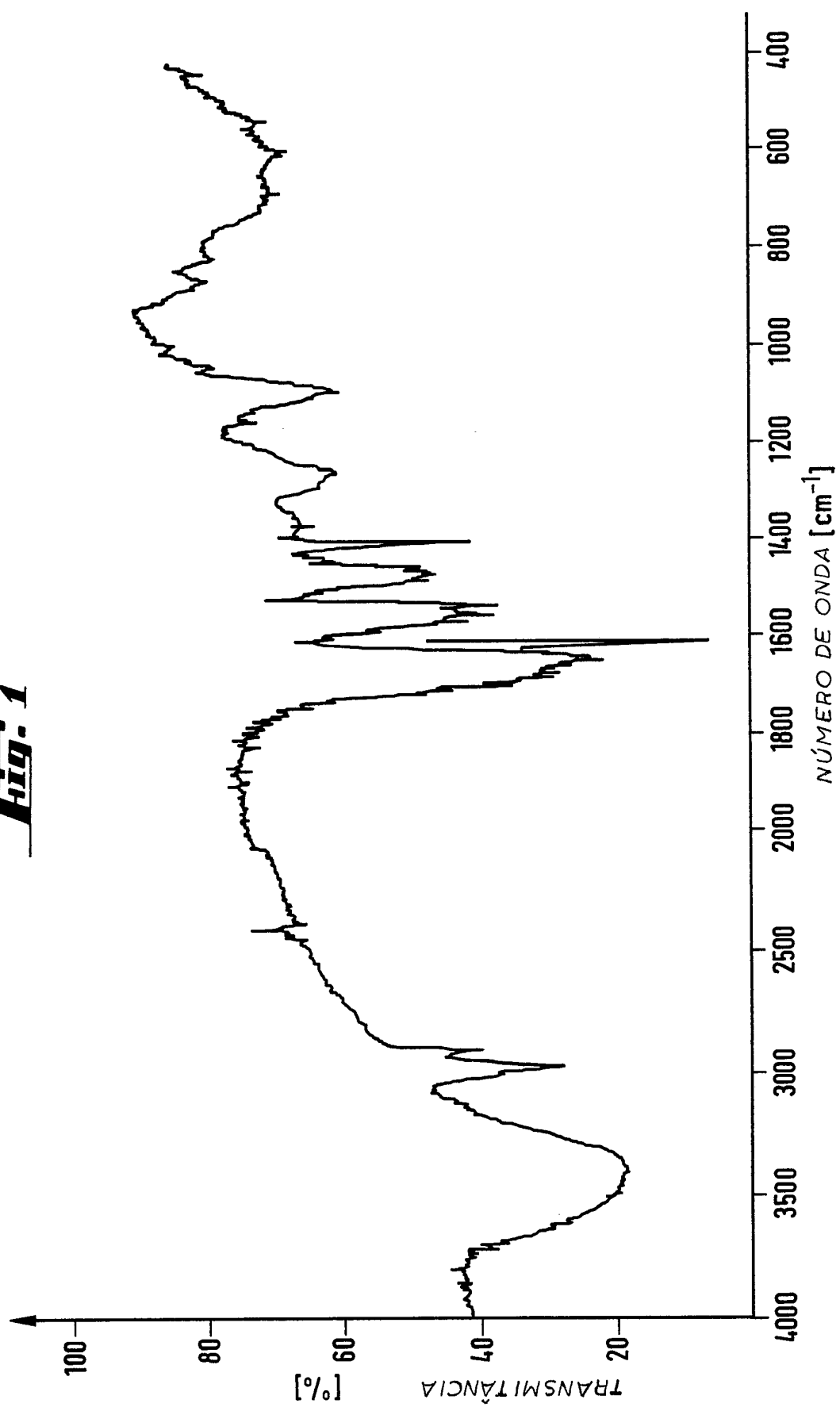


Fig. 1

Fig. 2

