

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

Este invento diz respeito a novos antibióticos desacil-A 40926 que resultam da desacilação microbiana do complexo antibiótico A 40926 ou dum seu factor. Os antibióticos desacil-A 40926 e os seus sais de adição são especialmente activos contra as bactérias gram-positivas.

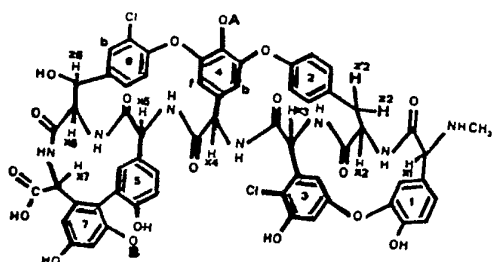
Estes antibióticos apresentam a fór-

=====
GRUPPO LEPETIT S.p.A.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS DESACIL-A 40926"

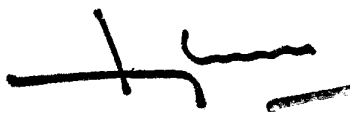
[Handwritten signature]

mula



em que A representa um grupo ácido 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucopiranosidurónico e B representa hidrogénio, alfa-D-manopiranosilo ou 6-acetil-alfa-D-manopiranosilo.

O processo de preparação consiste em se tratar um análogo de (I) em que A representa um grupo ácido 2-desoxi-2-(C₁₁-C₁₂)acilamino-beta-D-glucopiranosidurónico e B representa hidrogénio, alfa-D-manosilo ou 6-acetil-alfa-D-manosilo com uma cultura de crescimento de uma estirpe do género Actinoplanes.

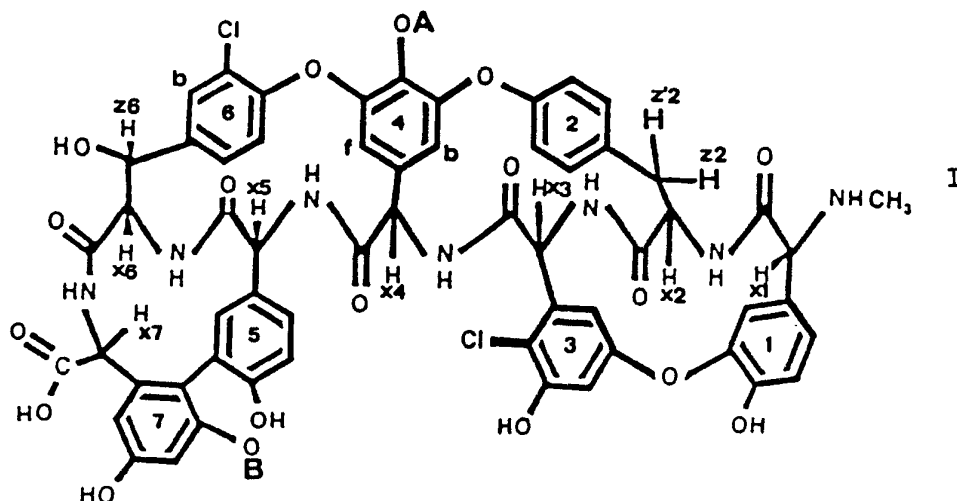


O antibiótico A 40926 é um antibiótico glicopeptídico que foi isolado duma cultura de Actinomadura, designada por Actinomadura sp. ATCC 39727. É um complexo cujo factores foram designados por factor A, factor B, factor Bo, Factor PA e factor PB. Foi descrito na PE-A-177882.

O antibiótico A 40926 pode ser transformado nos derivados N-acilaminoglucuronil-aglicona por hidrólise ácida sob condições controladas, como descrito na PE 86117452.

O complexo antibiótico A 40926, os seus factores, o complexo N-acilaminoglucuronil-aglicona correspondente e os seus factores, são principalmente activos contra bactérias gram positivas e Neisseriae.

O presente invento refere-se a novos derivados desacilamino dos compostos atrás mencionados que apresentam a característica comum de possuírem um grupo de N-acilaminoglucuronilo ligado a uma porção peptídica através duma ligação O-glicosídica. São designados por antibióticos desacil-A 40926, antibiótico desacil-A 40926 P e aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, e podem ser representados pela seguinte fórmula (I) (a numeração é análoga à sugerida por Williams J. et al. em J. Am. Chem. Soc., 106, 4895-4908 (1984) para outros antibióticos glicopeptídicos):

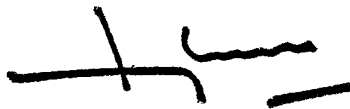


na qual

- A representa um grupo ácido 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucopiranosidurónico e
- B representa hidrogénio, alfa-D-manopiranosilo ou 6-acetil-alfa-D-manopiranosilo,
- e os seus sais de adição.

Estes derivados de-acilados serão designados colectivamente por "antibióticos desacil-A 40926" e genericamente cada um deles será designado como um "antibiótico desacil-A 40926".

Os materiais de partida atrás referidos, i.e. o complexo antibiótico A 40926 e os seus factores, o complexo correspondente N-acilaminoglucoronil-aglicona e os seus factores, podem ser representados pela fórmula (I) anterior, na qual A representa um grupo 2-desoxi-2-(C₁₁-C₁₂)-acilamino-beta-D-glucuronilo e B representa hidrogénio, um grupo alfa-D-manosilo ou 6-acetil-alfa-D-manosilo, ou um seu



sal de adição.

Mais particularmente, o factor A do antibiótico A 40926 é o composto com a fórmula anterior em que A representa 2-desoxi-2-undecanoilamino-beta-D-glucopiranosiduronilo e B representa manosilo, o factor Bo do antibiótico A 40926 é o composto da fórmula anterior, na qual A representa 2-desoxi-2-isododecanoilamino-beta-D-glucuronilo e B representa alfa-D-manosilo, o factor B₁ do antibiótico A 40926 é o composto com a fórmula anterior, na qual A representa 2-desoxi-2-dodecanoilamino-beta-D-glucuronilo e B representa alfa-D-manosilo.

Os factores do antibiótico A 40926 das séries "P", tais como os factores PZ e PBo, diferem dos factores correspondentes (factor A e B, respectivamente), pelo facto da unidade de manose ser substituída por uma unidade de 6-acetil-manose.

As N-acilaminoglucuronil-agliconas do antibiótico A 40926 são representadas pela fórmula anterior, em que A é como definido anteriormente e B representa hidrogénio. A sua cadeia acilo do grupo aminoglicuronilo corresponde às dos factores individuais do antibiótico A 40926.

Com base nos dados disponíveis e com referência a substâncias conhecidas, pode-se atribuir ao antibiótico desacil-A 40926 a fórmula anterior na qual A representa 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucuronilo e B representa alfa-D-manosilo, ao antibiótico desacil-A 40926 P a fórmula anterior na qual A representa 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucuronilo e B representa 6-acetil-alfa-D-manosilo e à aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 a fórmula anterior na qual A representa 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucuronilo e B representa hidrogénio.

Os factores PA e PB do antibiótico

A 40926, pelo menos sob certas condições de fermentação, são os produtos antibióticos principais do microorganismo produtor de A 40926.

Os factores A e B do antibiótico A 40926 são principalmente produtos de transformação dos factores PA e PB do antibiótico A 40926, respectivamente, e estão frequentemente, já presentes no caldo de fermentação.

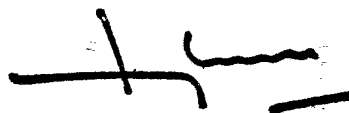
Descobriu-se que o factor PA do antibiótico A 40926 pode ser transformado no factor A do antibiótico A 40926 e que o factor PB do antibiótico A 40926 pode ser transformado no factor B do antibiótico A 40926, sob condições básicas, que conduzem à remoção do grupo acetilo da unidade de manose, sem deslocar o grupo acilo da unidade de aminoglucuronilo.

Como consequência, quando o caldo de fermentação, ou um seu extracto ou concentrado contendo o antibiótico A 40926, é deixado permanecer durante um determinado período de tempo sob condições básicas (p.e. solução aquosa duma base nucleofílica, a um pH > 9 durante a noite), obtem-se um complexo do antibiótico A 40926 que está enriquecido com os factores A e B do antibiótico A 40926 (veja-se PE-A-177882).

Pode-se utilizar o mesmo tipo de transformação básica para se converter o antibiótico desacil-A 40926 P no antibiótico desacil-A 40926 de de-acilo.

O antibiótico desacil-A 40926 tem as seguintes características fisico-químicas:

A) espectro de absorção de ultravioletas, que é mostrado na Figura 1 dos desenhos anexos, com os seguintes máximos de absorção:



	λ_{max} (nm)
a) HCl 0,1 M	282
b) tampão fosfato pH 6,0	281
c) tampão fosfato pH 7,4	282, 300 (bossa)
d) KOH 0,1 M	300

B) espectro de absorção de infravermelhos que é mostrado na Figura 2 dos desenhos anexos, com os seguintes máximos de absorção em pasta Nujol (ν , cm^{-1}):
 3700-3100; 3000-2800 (nujol); 1650; 1590; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1300; 1230, 1210, 1150, 1060, 1030, 970, 810, 720 (nujol)

C) espectro de ^1H -RMN que é mostrado na Figura 3 dos desenhos anexos, com os seguintes grupos de sinais (em ppm) a 270MHz registados em DMSO d_6 (hexadeuterodimetilsulfóxido) δ (ppm; m; (atribuições))
 2,30, s (N-CH_3); 2,49, s ($\text{DMSO}d_5$); 2,7-3,8, m (açúcar $\text{CH}'s$); 2,79 m (Z2); 4,08 m (X6); 4,33 s (X1); 4,37 d (X5); 4,37 d (X7); 4,86 m (X2); 5,08 s (4f); 5,08 s (Z6); 5,27 s (protão anomérico de manose); 5,35 d (protão anomérico de ácido aminoglucurónico); 5,61 d (X4); 5,86 s (4b); 6,05, d (X3); 7,73 s (6b); 6,45-8,49 (protões aromáticos e $\text{NH}'s$ peptídicos)

s = singelete; d = dobleto; m = multiplete

D) Tempo de retenção (Tr) de 0,34 relativamente à Vancomicina (Eli Lilly)

Coluna: sílica gel silanada Ultrasphere ODS (5 μm)

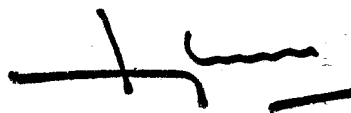
4,6 mmx25cm Altesx (Beckman)

Eluição isocrática com tampão de fosfato de sódio 18 mM/
 CH_3CN 92/8 (v/v)

Caudal: 1,8 ml/min

Deteção: UV 254 nm

Padrão interno: Vancomicina (Eli Lilly) Tr 8,4 min



E) Peso molecular de 1548, conforme determinado por espectroscopia BAR-EM.

Por comparação com os dados físico-químicos dos materiais de partida, com referência particular para o espectro de RMN, verifica-se que os picos correspondentes aos prótons alifáticos dentro do intervalo de 0,8-2,0 ppm já não estão presentes na nova molécula.

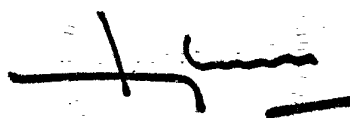
Também no caso do antibiótico desacil-A 40926 P e da aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, a principal diferença entre os espectros de RMN destes compostos e os dos compostos correspondentes "acilados" é a ausência de sinais de prótons alifáticos no intervalo 0,8-2,0 ppm.

Mais particularmente, o espectro de ^1H -RMN do antibiótico desacil-A 40926 P de de-acilo tem os seguintes grupos de sinais (ppm) a 270 MHz, registados em DMSO d_6 $\int$ ppm, m, (atribuição) 7:

2,0, s (CH_3CO); 2,3, s (NCH_3); 2,5, s (DMSO d_5); 2,7-3,8, m CH's (do açúcar); 2,8, m (Z2); 4,1, m (X_6); 4,1, m (CH_2O , açúcar); 4,4 s (X_1); 4,4 d (X_5); 4,4 d (X_7); 4,9 m (X_2); 5,1, s (4f); 5,1, s, (Z6); 5,3, s (próton anomérico de manose); 5,4, d (próton anomérico de ácido aminoglucurónico); 5,6, d (X_4); 5,8, s (4b); 6,1 d (X_3); 7,7 s (6b); 6,5-8,6 (NH's aromáticos e peptídicos).

O espectro de ^1H -RMN da aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 tem o seguinte grupo de sinais (ppm) a 270 MHz, registado em DMSO d_6 $\int$ ppm, m, (atribuição) 7:

2,3, s (NCH_3); 2,5, s (DMSO d_5); 2,7-3,8 m CH's (do açúcar); 2,8, m (Z2); 4,1, m (X_6); 4,4, s (X_1); 4,4, d (X_5); 4,4 d (X_7); 4,9, m, (X_2); 5,1, s (4f);



5,1, s (Z6); 5,4 d (protão anomérico de ácido aminoglucurónico); 5,5 d (X4); 5,7, s (4b); 6,1, d (X3); 7,7, s (6b); 6,2-8,5 (NH's aromáticos e peptídicos).

A actividade antibacteriana dos compostos do invento pode ser demonstrada in vitro através de ensaios padrões de diluição em diferentes culturas de microorganismos.

Os meios de cultura e as condições de crescimento para determinação de CIM (Concentração inibidora mínima) foram as seguintes: caldo do Isosensitest (Oxoid), 24 h, para staphilococci, Strp. faecalis e bactérias Gram-negativas (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae); caldo Todd-Hewitt (Difco), 24 h para as outras espécies de streptococcus; caldo de base GC (Difco) + Isovitalex (BBL) a 1%, 48 h, atmosfera enriquecida em CO₂ para Neisseria gonorrhoeae; caldo de Cérebro Coração (Difco) + Supplement C a 1% (Difco), 48 h para Haemophilus influenzae; caldo AC (Difco), 24 h, atmosfera anaeróbica para Clostridium perfringens; caldo PPLO com suplementos, como em R.T. Evans e D. Taylor-Robinson (J. Antimicrob. Chemother. 4, 57), 24 h para U. urealyticum. A incubação deu-se a 37°C. Os inóculos foram os seguintes: cerca de 10⁴ de unidades de mudança de cor/ml para U. urealyticum; cerca de 10⁴-10⁵ unidades de formação de colónia/ml para outras CIMs de diluição de caldo.

As concentrações inibidoras mínimas (CIM, microg/ml) para alguns microorganismos são referidos no Quadro I.

QUADRO I

Estirpe	C.I.M. (microg/ml)	
	Antibiótico A 40926 de de-acilo	
<u>Staph. aureus</u> L165	1	
<u>Staph. aureus</u> (10 ⁶ cfu/ml)	2	
<u>Staph. aureus</u> (soro de bovino a 30%)	2	
<u>Staph. epidermidis</u> L147 ATCC 12228 (coagulase negativa)	2	
<u>Staph. haemolyticus</u> L602 (isolado clínico)	32	
<u>Strep. pyogenes</u> L49 C203	0,25	
<u>Strep. pneumoniae</u> L44 UC41	0,25	
<u>Strep. faecalis</u> L149 ATCC 7080	2	
<u>Strep. mitis</u> L796 (isolado clínico)	0,5	
<u>Clostridium perfringens</u> L290 ISS 30543	0,13	
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> L997 ISM68/126	64	
<u>Haemophilus influenzae</u> L 970 tipo b ATCC 19418	128	
<u>Escherichia coli</u> L47 SKF 12140	>128	
<u>Proteus vulgaris</u> L79 X19H ATCC881	>128	
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> L4 ATCC10145	>128	
<u>Ureaplasma urealyticum</u> L1479 (isolado clínico)	>128	
<u>Klebsiella pneumoniae</u> L142	>128	



A aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e o antibiótico A 40926 P mostram praticamente o mesmo nível de actividade antimicrobiana que o indicado anteriormente para o antibiótico desacil-A 40926.

A actividade antimicrobiana dos compostos do invento é confirmada também por septicemia experimental em ratos.

Os grupos de controlo e de tratamento compreendem dez ratos CD-1 (Charles River) pesando 18-22 g. Eles são injectados intraperitonealmente com 0,5 ml de suspensão bacteriana preparada por diluição duma cultura do dia anterior de S. pyogenes C203 (L 49) com salina peptonizada esterilizada. Os inóculos são ajustados de modo que os animais não tratados morram de septicemia ao fim de 48 horas. Os compostos a serem encaixados são administrados subcutâneamente imediatamente após a injeção. No sétimo dia, o DE_{50} em mg/kg é calculado pelo método de Spearman e Kärber (D.J. Finney "Métodos Estatísticos em Ensaio Biológicos", Griffin, página 524, 1952), a partir da percentagem de animais sobreviventes para cada dose.

Por exemplo, sob estas condições, o DE_{50} do antibiótico desacil-A 40926 é de 2,33 mg/kg, s.c..

Os antibióticos desacil-A 40926 possuem funções ácidas e básicas e podem formar sais com iões orgânicos e inorgânicos contrários, de acordo com processos convencionais.

Sais de adição de ácido representativos e adequados dos compostos do invento incluem aqueles sais formados por reacção padrão com ácidos orgânicos e inorgânicos tais como, por exemplo, clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacé-

tico, succínico, cítrico, ascórbico, láctico, maleico, fumárico, palmítico, cólico, pamóico, mícico, glutâmico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanossulfônico, benzenossulfônico, sórbico, pícrico, benzóico, cinâmico, etc.

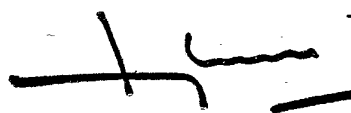
Exemplos representativos destas bases são: hidróxido de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso tais como hidróxido de sódio, potássio, cálcio, magnésio, bário; amônia e aminas orgânicas alifáticas, alicíclicas ou aromáticas tais como metilamina, dimetilamina, trimetilamina e picolina.

A transformação dos compostos "não-sal" do invento nos sais de adição correspondentes, e o inverso, i.e. a transformação dos sais de adição dum composto do invento na forma não-salina, estão dentro da técnica corrente e são abrangidos pelo presente invento.

Por exemplo, o antibiótico desacil-A 40926, a aminoglucuronilo-aglicona de A 40926 ou o antibiótico desacil-A 40926 P podem ser transformados no sal de adição de ácidos ou de bases correspondente por dissolução da forma não-salina num solvente aquoso e adição dum ligeiro excesso molar do ácido ou base escolhidos. A suspensão ou solução resultante é então liofilizada para se recolher o sal desejado.

No caso do sal final ser insolúvel num solvente onde a forma não-salina seja solúvel, ele é recolhido por filtração da solução orgânica da forma não-salina, após a adição da quantidade estequiométrica ou dum ligeiro excesso molar do ácido ou base escolhidos.

A forma não-salina pode ser preparada a partir dum sal ácido ou de base correspondente dissolvido



num solvente aquoso que é então neutralizado para libertar a forma não-salina.

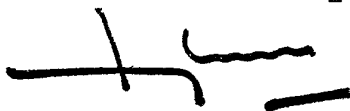
Quando a seguir a esta etapa, é necessário eliminar-se um excesso de ácido ou base, pode-se empregar um processo de dessalificação comum.

Por exemplo, pode-se utilizar convenientemente cromatografia de coluna sobre sílica gel silanizada, poliestireno não-funcionalizado, resinas de polidextrano de poros controlados ou acrílicos (tais como (Sephadex LH 20) ou carvão activado. Após eluição dos sais indesejados com uma solução aquosa, o produto desejado é eluído com um gradiente linear ou um gradiente de degraus duma mistura de água com um solvente orgânico polar ou apolar, tal como acetonitrilo/água, desde 50:50 até 100% de acetonitrilo.

Como é sabido nesta especialidade, a formação de sal ou com ácidos (ou bases) farmacêuticamente aceitáveis ou com ácidos (ou bases) não-farmacêuticamente aceitáveis pode ser utilizada como uma técnica de purificação conveniente. Após a formação e isolamento, a forma salina dum antibiótico A 40926 pode ser transformada na forma não-salina correspondente, ou numa forma salina farmacêuticamente aceitável.

Em alguns casos, um sal de adição de base dum antibiótico desacil-A 40926 é mais solúvel em água e em solventes hidrofílicos.

O antibiótico desacil-A 40926, o antibiótico desacil-A 40926 P e a aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 são preparados a partir do complexo antibiótico A 40926, ou dum seu factor, do factor PA ou do factor PB, ou duma sua mistura do antibiótico A 40926, e do complexo N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926,

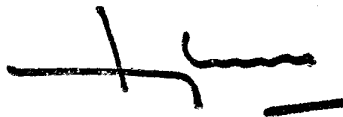


ou dum seu factor, respectivamente, por meio duma transformação microbiológica com estirpes adequadas de Actinoplanes tais como Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121, Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, Actinoplanes missouriensis NRRL 15647 ou NRRL 15646, e Actinoplanes NRRL 3884. Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 é descrita na patente Norte Americana 4.239.751, Actinoplanes missouriensis ATCC 23342 é descrita na patente Norte Americana 3.952.095, Actinoplanes missouriensis NRRL 15647 e NRRL 15646 são descritas na patente Norte Americana 4.587.218, enquanto que Actinoplanes NRRL 3884 é descrita na patente Norte Americana 3.780.174. Todas estas estirpes são possíveis de obter junto das respectivas colecções de cultura.

Mais particularmente, o material de partida escolhido, quer na forma pura quer na forma de quaisquer suas preparações em bruto, incluindo caldo de fermentação colhido de Actinoplanes sp. ATCC 39727 ou um mutante produtor, ou uma variante do mesmo, é posto em contacto com uma cultura duma estirpe de Actinoplanes tal como Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121, Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, Actinoplanes missouriensis NRRL 15646, Actinoplanes missouriensis NRRL 15647 ou Actinoplanes NRRL 3884, preferivelmente durante a fermentação.

Uma estirpe de Actinoplanes, tal como preferivelmente Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121, Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, Actinoplanes missouriensis NRRL 15646, Actinoplanes missouriensis NRRL 15647 ou Actinoplanes NRRL 3884, é cultivada sob condições aeróbicas submersas correntes num meio contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos. Exemplos de tais meios são aqueles referidos nas patentes Norte Americanas atrás citadas e aqueles genericamente conhecidos na especialidade.

Geralmente, o material de partida mencionado anteriormente pode ser adicionado a uma cultura duma



estirpe de Actinoplanes, por exemplo Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121, Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, Actinoplanes missouriensis NRRL 15646, Actinoplanes missouriensis NRRL 15647 ou Actinoplanes NRRL 3884, ao fim dum período de tempo que varia desde o tempo zero até à altura em que a cultura atingiu o seu crescimento máximo. A adição ao fim de 36-72 h de crescimento é, pelo menos em alguns casos, preferida.

A temperatura de reacção situa-se geralmente entre 20°C e 40°, e preferivelmente entre 24°C e 35°C, e mais preferivelmente entre 25°C e 32°C.

O tempo de reacção, i.e. o tempo de exposição do material de partida do meio de cultura microbiano antes da recolha do produto final, pode variar entre 100 e 300 h, dependendo das condições específicas empregues. De qualquer modo, uma vez que a reacção pode ser monitorizada de forma conhecida na especialidade, por exemplo por acompanhamento da diminuição do material de partida e/ou aumento do produto final por CLAP, o técnico da especialidade é capaz de determinar rapidamente a altura em que a reacção pode ser considerada como completa e em que o processo de recolha pode ser iniciado.

Em vez de se utilizar uma cultura de crescimento numa estirpe de Actinoplanes, tal como Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121, Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, Actinoplanes missouriensis NRRL 15646, Actinoplanes missouriensis NRRL 15647 ou Actinoplanes NRRL 3884, pode-se empregar uma cultura de qualquer mutante ou variante da mesma, que seja ainda capaz de desacilar o material de partida atrás mencionado para produzir os compostos desacilados do invento. Qualquer processo de acordo com o presente invento que empregue qualquer um destes mutantes ou variantes, é considerado estar abrangido pelo âmbito do presente invento. Ac-

tualmente, as Actinoplanes missouriensis NRRL 15646 e NRRL 15647 são obtidas por mutagenese da Actinoplanes missouriensis ATCC 31683 que é por sua vez um produto de mutação da Actinoplanes missouriensis ATCC 23342. A actinoplanes missouriensis ATCC 31683 é descrita nas patentes Norte Americanas 4.322.406 e 4.375.513 com as Actinoplanes missouriensis ATCC 31682 e ATCC 32680 e pode ser obtida junto da colecção de cultura, bem como as outras estirpes de Actinoplanes mencionadas.

Uma estirpe mutante de Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 foi depositada em 21 de Julho de 1987 com ATCC, onde recebeu o número de entrada 53649. Esta estirpe foi depositada ao abrigo das cláusulas do Tratado de Budapeste.

Em vez de se utilizarem culturas puras individuais dos microorganismos de desacilação anteriores, pode-se empregar uma sua mistura em qualquer proporção.

Os compostos do presente invento podem ser preparados de acordo com o processo do invento também por utilização do micélio lavado de uma das culturas de microorganismos de desacilação atrás identificados, convenientemente ressuspenso num meio fisiologicamente aceitável, uma preparação livre de células obtida por ruptura das células, p.e. por ultra-sons e recolha dos restos por centrifugação, ou um extrato ou concentrado solúvel em água livre de células, obtido por preparação de células rebentadas. O tempo e temperatura de reacções podem necessitar duma certa adaptação neste caso, mas serão praticamente semelhantes aos indicados anteriormente para toda a cultura microbiana, mesmo que a temperatura seja aumentada, pelo menos em alguns casos, até 50°-60°C, e preferivelmente até entre 25°C e 50°C.

A recolha das substâncias antibióticas de meio de reacção é então conduzida de acordo com téc-

nicas conhecidas per se, as quais incluem extracção com solventes, precipitação por adição de não-solventes ou mudança do pH da solução, cromatografia de repartição, cromatografia de repartição de fase inversa, cromatografia de permuta de iões, cromatografia de afinidade, etc.

Um processo preferido inclui cromatografia de afinidade em D-Alanil-D-Alanina imobilizada, seguida por separação a um pH diferente.

Matrizes de D-Alanil-D-Alanina imobilizada adequadas para o presente processo de recolha são divulgadas na Publicação do Pedido de Patente Europeia No. 122969. A matriz preferida neste processo de recolha é D-Alanil-D-Alanina ligada a um polidextrano de ligação cruzada de poros controlados, a qual é também aqui descrita.

O meio de reacção pode logo ser sujeito a cromatografia de afinidade após filtração ou após uma etapa de purificação preliminar. Esta última etapa compreende tornar básico todo o meio, preferivelmente entre pH 8,5 e 10,5 e depois filtrá-lo na presença dum auxiliar de filtração, se conveniente. Se o meio de reacção for mantido durante um determinado período de tempo com um pH básico, o antibiótico A 40926 P de de-acilo é transformado no antibiótico A 40926 de de-acilo, análogamente à transformação, sob as mesmas condições, dos respectivos materiais de partida. (Esta transformação pode ser monitorizada por CLAP, como é normal).

O pH do filtrado transparente é então ajustado para um valor entre 7 e 8 e depois submetido a uma cromatografia de afinidade em D-Alanil-D-Alanina imobilizada, ou em coluna ou em parcelas descontínuas de elementos.

Apesar da ligação da substância à ma-

triz de afinidade ser efectuada preferivelmente a um pH de cerca de 7,0-8,0, a sua eluição é levada a cabo com valores de pH mais básicos (preferivelmente entre 9,0 e 10,5), por meio duma base aquosa. Esta base aquosa pode ser amónia, uma amina volátil, um alcali ou um hidróxido de metal alcalino, ou uma solução tamponada básica facultativamente na presença dum solvente orgânico polar, tal como um solvente miscível em água polar.

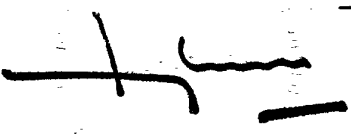
Exemplos representativos de solventes miscíveis em água polares são: álcoois solúveis em água (tais como metanol, etanol, iso-propanol, n-butanol), acetona, acetonitrilo, alcanoatos de alquilo inferior (tais como acetato de etilo), tetrahidrofurano, dioxano e dimetilformamida, e suas misturas; em que o solvente miscível em água polar preferido é acetonitrilo.

Após remoção das impurezas por lavagem da coluna com tampão aquoso pH 4-9, facultativamente contendo sais, ureia e/ou solventes miscíveis em água, a substância antibiótica A 40926 de de-acilo é eluída com a mistura de eluição anterior.

Este eluído é ajustado para pH 2,5-4,0 com um ácido orgânico ou mineral para remover os materiais que são insolúveis a este pH.

O precipitado é removido por filtração ou centrifugação e o sobrenadante contendo o antibiótico A 40926 é então convenientemente dessalificado.

Um processo de dessalificação conveniente compreende a aplicação da solução aquosa contendo o antibiótico a uma coluna de sílica gel silanizada, a lavagem com água destilada e a eluição com uma mistura dum solvente miscível em água polar, como definido anteriormente, e água.



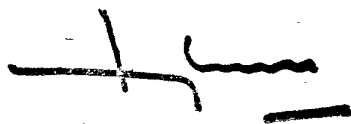
Alternativamente, a dessalificação pode ser efectuada por aplicação da solução contendo o antibiótico à coluna de afinidade descrita anteriormente, lavagem com água destilada e eluição com uma base aquosa volátil, como descrita anteriormente, para eluição da cromatografia de afinidade.

O produto obtido, nomeadamente o antibiótico desacil-A 40926, aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 ou o antibiótico A 40926 P, é obtido praticamente puro por concentração das fracções eluídas contendo o mesmo (análise de CLAP), seguida por precipitação pela adição dum não solvente ou liofilização.

Exemplos de não-solventes são cetonas miscíveis em água tais como acetona ou metiletil cetona, ou álcoois miscíveis em água tais como metanol, etanol, propanol, etc, bem como suas misturas com solventes orgânicos miscíveis em água tais como éter de petróleo, éteres de alquilo inferior, tais como éter etílico, éter propílico e éter butílico.

O antibiótico desacil-A 40926, o antibiótico desacil-A 40926 P e a aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 são activos contra bactérias gram-positivas que são responsáveis por muitas das injecções largamente difundidas. Dado o aumento de resistência destes patogenos aos tratamentos terapêuticos correntes, a necessidade de novas substâncias antibióticas continua a ser grande!

Em geral para tratamento anti-bacteriano, o antibiótico desacil-A 40926, o antibiótico desacil-A 40926 P e a aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, bem como os seus sais farmacêuticamente aceitáveis não-tóxicos, os suas misturas, podem ser administrados por diferentes vias, tais como topicamente ou parentéricamente. A administração parentérica é, em geral, a via preferida de



administração.

As composições para injeção podem tomar as formas de suspensões, soluções, ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter adjuvantes tais como agentes de suspensão, de estabilização e/ou de dispersão.

Alternativamente, o ingrediente activo pode estar na forma dum pó para reconstituição na altura de administração, quando se lhe adiciona um veículo adequado, tal como água esterilizada.

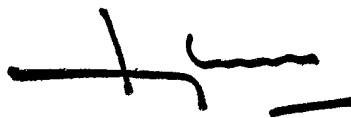
Dependendo da via de administração, estes compostos podem ser formulados em várias formas de dosagem.

Em alguns casos, pode ser possível formular os compostos do invento em formas de dosagem entérico-revestidas para administração oral, as quais podem ser preparadas de forma conhecida na técnica (veja-se por exemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", décima quinta edição, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvânia, EUA, página 1614).

Este pode ser especialmente o caso quando a absorção da substância antimicrobiana no tracto entérico é particularmente desejada, ao mesmo tempo que passa inalterada através do tracto gástrico.

A quantidade de princípio activo a ser administrada depende de variados factores, tais como o tamanho e o estado do indivíduo a tratar, a via e a frequência de administração, e o agente causativo em questão.

As substâncias antibióticas do presente invento, nomeadamente o antibiótico desacil-A 40926 ,o



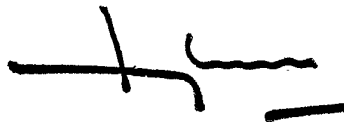
antibiótico desacil-A 40926 P de de-acilo e a aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e os seus sais fisiologicamente aceitáveis, são geralmente eficazes com uma dose diária que varia entre cerca de 0,5 e 50 mg de ingrediente activo por quilograma de peso corporal do doente, facultativamente dividida por 1 a 4 administrações diárias.

Composições particularmente desejáveis são aquelas preparadas em unidades de dosagem contendo desde cerca de 100 até cerca de 5.000 mg por unidade.

Formulações de acção continuada podem ser preparadas baseadas em diferentes mecanismos e métodos, como é do conhecimento na especialidade.

Um método preferido para a preparação duma emulsão de acção continuada contém o antibiótico desacil-A 40926, o antibiótico desacil-A 40926 P de de-acilo ou a aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, compreende a utilização duma forma insolúvel em água do antibiótico suspenso num meio aquoso ou oleoso.

De preferência, as preparações farmacêuticas do invento, destinam-se a terapia (incluindo prevenção, tratamento, cura, etc.) de seres humanos, apesar dos primatas e mamíferos em geral, bem como os animais de estimação, poderem ser tratados com os compostos e preparações do invento.



Preparação de composições farmacêuticas:

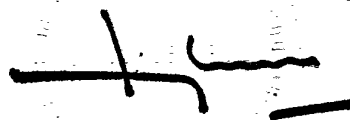
Prepara-se uma forma de dosagem unitária para injeção intramuscular com 5 ml de suspensão esterilizada USP contendo propileno glicol a 8% e com 500 mg dum sal de adição de base fisiologicamente aceitável do antibiótico desacil-A 40926 de de-acilo.

Prepara-se uma forma de dosagem unitária para injeção intramuscular com 5 ml duma suspensão esterilizada USP contendo propileno glicol a 8% e com 500 mg dum sal de adição de base fisiologicamente aceitável de aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926.

Prepara-se uma forma de dosagem unitária para injeção intramuscular com 5 ml duma suspensão esterilizada USP contendo propileno glicol a 8% e com 250 mg dum sal de adição de base fisiologicamente aceitável de aglicon de aminoglucuronilo do antibiótico A 40926.

Prepara-se uma forma de dosagem unitária para injeção intramuscular com 1.000 mg de aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, em forma insolúvel em água, suspenso em 5 ml de água esterilizada para injeção.

Por outro lado, as substâncias antibióticas do invento podem ser úteis para suprimir o crescimento de Clostridium difficile, que causa a colite pseudomembranosa no intestino. Estes antibióticos podem ser utilizados no tratamento da colite pseudomembranosa, por administração oral duma dose eficaz dos antibióticos, ou dum seu sal farmacêuticamente aceitável, preparados segundo uma forma de dosagem farmacêuticamente aceitável. Para tal, utilização, os antibióticos podem ser administrados em cápsulas de gelatina ou numa suspensão líquida.



Para além da sua actividade como medicamento, o antibiótico desacil-A 40926, o antibiótico desacil-A 40926 P e a aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis, podem ser utilizados como promotores de crescimento animal.

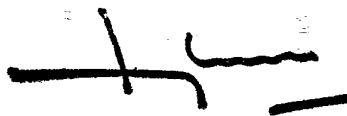
O termo "animal" neste contexto é entendido como compreendendo qualquer animal de sangue quente não humano, em particular aqueles criados fundamentalmente como uma fonte de material para consumo humano, e animais de estimação.

Pate este fim, administra-se oralmente o composto do invento numa comida adequada. A concentração exacta empregue é aquela que é necessária para proporcionar a quantidade eficaz de promoção de crescimento do agente activo, quando se consomem quantidades normais de comida.

A adição do composto activo do invento à comida do animal é preferivelmente levada a cabo por preparação duma pré-mistura alimentar apropriada contendo o composto activo numa quantidade eficaz e incorporando a pré-mistura na ração completa.

Alternativamente, um concentrado intermediário ou um suplemento alimentar contendo o ingrediente activo pode ser misturado na comida.

A via pela qual tais pré-misturas alimentares e rações completas podem ser preparadas e administradas são descritas nos livros de referência (tais como "Applied Animal Nutrition", N.H. Freedman e Co., S. Francisco, EUA, 1969 ou "Livestock Feeds and Feeding" livros O e B, Corvallis, Oregon, EUA, 1977), os quais são aqui incluídos por referência.



A preparação do complexo antibiótico A 40926, e dos seus factores individuais, a partir de Actinomadura sp. ATCC 39727, ou dum seu mutante ou variante de produção, é descrita na PE-A-177882.

Preparação de N-acilaminoglucuronil-agliconas do antibiótico A 40926:

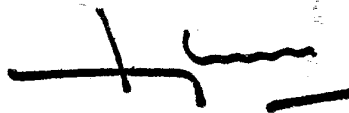
O composto AB de N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, o factor A da N-acilaminoglucuronil-aglicona, o factor B da N-acilaminoglucuronil-aglicona, o factor B da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, o factor B₁ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e a aglicona do antibiótico A 40926 são preparados a partir do complexo do antibiótico A 40926, ou dum factor individual, ou duma mistura dos referidos factores em qualquer proporção, i.e. o factor A de A 40926, o factor B de A 40926, o factor PA de A 40926, o factor PB de A 40926, o factor Bo de A 40926 e o factor B, de A 40926, por hidrólise ácida controlada.

Geralmente, esta hidrólise é conduzida na presença dum ácido forte, num solvente orgânico adequado. A temperatura de reacção pode variar consideravelmente; preferivelmente está entre 4°C e 100°C e mais preferivelmente entre 25°C e 80°C.

O tempo de reacção varia dependendo das condições de reacção específicas.

Geralmente, o tempo de reacção está entre 30 min e 120 horas.

Contudo, uma vez que o curso da reacção pode ser monitorizado por CCF ou CLAP, o técnico espe-



cialista é capaz de decidir quando é que a hidrólise dos materiais de partida pode ser considerada completa e quando é que o processo de recolha pode ser iniciado.

Exemplos representativos de ácidos fortes são ácidos fortes minerais ou orgânicos tais como haletos de hidrogénio, p.e. cloreto, brometo e iodeto de hidrogénio, ácidos fosfóricos, ácido sulfúrico, ácidos haloacéticos, p.e. ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido clorodifluoroacético, etc.

Solventes orgânicos adequados são tais que:

- a) possam pelo menos solubilizar parcialmente os materiais de partida;
- b) os produtos, uma vez obtidos, ou estão separados ou podem ser separados deles de acordo com técnicas correntes; e
- c) em qualquer caso, eles não interferem desfavoravelmente com o curso da reacção.

Exemplos dos referidos solventes orgânicos são solventes próticos ou apróticos tais como sulfóxidos de alquilo (C_1-C_4), p.e. dimetilsulfóxido e dietilsulfóxido, formamidas de alquilo (C_1-C_4), p.e. dimetilformamida, dietilformamida, dioxano, tetraidrofurano e solventes similares, que sejam evidentemente compatíveis com o ácido escolhido. Geralmente, a hidrólise é conduzida na presença duma quantidade limitada de água, p.e. de 0,1 a 10% (p/p) da mistura de reacção. Esta quantidade de água pode obviamente já estar presente ou nos materiais de partida, solventes e/ou reagentes, ou pode ser adicionada ad hoc, se necessário.

Um modelo de realização preferido deste processo é representado pela utilização duma mistura de dimetilsulfóxido/ácido clorídrico concentrado a uma tempera-

tura entre 40°C e 80°C. Típicamente, a relação da mistura dimetilsulfóxido/ácido clorídrico concentrado varia entre 8:2 e 9,5:0,5. O ácido clorídrico preferido é ácido clorídrico a 37% (p/p).

Geralmente, o produto de reacção é uma mistura dos aglicons de N-acilaminoglucuronilo e do aglicon. Por controlo da temperatura e, em alguns casos, também da concentração e força do ácido, é possível dirigir o processo, pelo menos até uma determinada extensão, para a produção de um ou dois produtos principais, i.e. N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 ou a aglicona do antibiótico A 40926. Mais particularmente, por manutenção duma temperatura relativamente baixa, possivelmente por redução da força da mistura de ácido e por controlo adequado do tempo de reacção, as produções das N-acilaminoglucuronil-agliconas aumentadas, enquanto que temperaturas relativamente altas e tempos superiores produzem o alicon isoladamente.

Também neste caso, o curso da reacção é monitorizado por CCF ou preferivelmente por CLAP, e a reacção pode ser interrompida quando se atinge a produção óptima da substância desejada, a fim de maximizar as produções do subsequente processo de recolha.

Quando um produto obtido é uma mistura de N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e do aglicon do antibiótico A 40926, ela pode ser separada por cromatografia, por exemplo cromatografia líquido/líquido, cromatografia "flash", cromatografia líquida de alta pressão e cromatografia de afinidade.

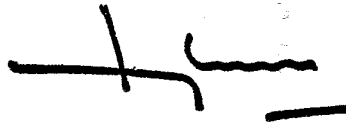
Quando se utiliza cromatografia de afinidade, um adsorvente preferido é uma D-Alanil-D-Alanina imobilizada, como descrito na PE-A-122969. Particularmente preferida é agarose-epsilon-aminocaproil-D-Alanil-D-Alanina. A mistura de eluição é uma mistura dum tampão aquoso com uma

solução salina. Por ajuste do pH e da concentração salina, as N-acilaminoglucuronil-agliconas do antibiótico A 40926 são separadas da aglicona do antibiótico A 40926.

Um processo preferido para preparar prevalecentemente o complexo AB, ou um seu factor, de N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 é um processo que compreende a sujeição do complexo antibiótico A 40926, ou dum seu factor individual, do complexo AB do antibiótico A 40926, do factor A do antibiótico A 40926, do factor B do antibiótico A 40926, do factor Bo do antibiótico A 40926, do factor B₁ do antibiótico A 40926, do factor PA do antibiótico A 40926 e do factor PB do antibiótico A 40926 a hidrólise ácida controlada com uma mistura dum solvente aprótico polar e dum mineral forte ou ácido orgânico, na presença duma quantidade limitada (0,1-10%, p/p) de água, a uma temperatura entre a temperatura ambiente e 100°C, e preferivelmente entre 40°C e 65°C, durante um período desde 3 horas até 120 horas.

Mais preferivelmente, a mistura hidrolizante é uma mistura de dimetilsulfóxido e ácido clorídrico a 37% desde 9:1 até 9,5:0,5, a temperatura é 65°C e o tempo de reacção é de 5 horas.

Quando o material de partida para a preparação da N-acilaminoglucuronil-aglicona e o composto antibiótico A 40926, obtém-se um produto final que é ainda uma mistura de factores substancialmente correspondentes aos do complexo original, enquanto que, quando se utiliza um factor individual, tal como o factor A ou o factor B do antibiótico A 40926, obtém-se um factor individual de N-acilaminoglucuronil-aglicona, que é respectivamente o factor A da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e o factor B da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 (que pode por sua vez ser separado no factor Bo e B₁).



Quando se obtém um complexo AB da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, ele pode ser separado nos seus factores individuais por técnicas conhecidas per se, tais como cromatografia líquido/líquido e preferivelmente CLAP preparativa.

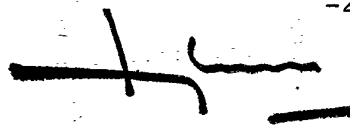
Um processo preferido compreende cromatografia líquida de fase invertida, preferivelmente em colunas de aço inoxidável sob pressão moderada (5-50 bar), ou a pressão elevada (100-200 bar). A fase sólida pode ser uma sílica gel silanizada com uma fase de hidrocarbonetos nos átomos de carbono (2-18) (mais preferivelmente C18) ou um grupo fenilo e o eluente é uma mistura dum solvente miscível em água polar, como definido anteriormente, e um tampão aquoso com um pH compatível com a resina (preferivelmente pH 4-8).

Mais preferida é uma mistura de eluição de gradiente linear dum solvente aprótico polar solúvel em água escolhido entre acetonitrilo e uma solução aquosa tampão com um pH entre 4 e 8 e preferivelmente cerca de 6, por exemplo um gradiente linear desde 5% a 45% duma mistura de acetonitrilo/tampão fosfato, pH 6, 70:30 e uma mistura de acetonitrilo/tampão fosfato, pH 6, 10:90.

O complexo AB da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 (na forma de não-sal de adição) tem as seguintes características:

A) espectro de absorção de ultravioletas com os seguintes máximos de absorção:

	λ_{max} (nm)
a) HCl 0,1 N	282
b) tampão fosfato pH 7,4	282
	310 (bossa)
c) KOH 0,1	302



B) espectro de absorção de infravermelhos com os seguintes máximos de absorção (cm^{-1}):

3700-3100; 3000-2800 (nujol); 1650; 1620 -1550; 1500;
1460 (nujol); 1375 (nujol); 1300; 1250-1180; 1150; 1060;
1010; 970; 930; 840, 820

C) espectro de ^1H -RMN com os seguintes grupos de sinais (em ppm) a 270 MHz registados em DMSO d_6 (hexadeuterodimetilsulfóxido) mais CF_3COOH , utilizando-se TMS como padrão interno (0,00 ppm), (δ = ppm):

0,84, d e t CH_3 's isopropílico e CH_3 terminal; 1,14, m $(\text{CH}_2)_n$; 1,44 m $\text{CH}_2\text{-C-CO}$ e CH isopropílico; 2,00, t $\text{CH}_2\text{-(CO)}$; 2,5 s (DMSO-d_5); 2,5 s (N-CH_3); 2,93, m CH , (Z2); 3,33, m CH , (Z'2); 3,20-3,80, m açúcar CH's; 5,34, d próton anomérico de ácido acilaminoglucurónico; 4,10 m (X6); 4,33 d, (X5); 4,43 d (X7); 4,9 m (X2); 5,1 (4f e Z6); 5,4 s (X1); 5,58 d (X4); 5,7 s (4b); 6,06 d (X3); 7,73 s (6b); 6,26-8,42 s e m CH 's aromáticos e NH's peptídicos; 8,70-10,5, br s OH 's fenólico e NH_2^+

br = largo

d = duplete

m = multiplete

s = singelete

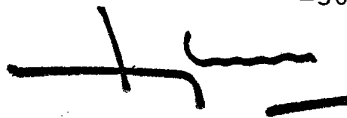
t = triplete

D) Tempo de retenção (T_r) de 1,20 e 1,30 relativamente ao componente 2 de Teicoplanina A_2 (T_r = 20,3 min), quando analisados por Clap de fase invertida, sob as condições seguintes:

coluna: Ultrasphere ODS ($5 \mu\text{m}$) Altex (Beckman) 4,6 mm
(d.i.)x250 mm

pré-coluna: Laboratórios Brownlee RP 18 ($5 \mu\text{m}$)

eluente A: CH_3CN 10% } ajustado para
(2,5 g/l) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 90% } pH 6,0



eluente B: CH_3CN 70% ajustado para
(2,5 g/l) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30% pH 6,0

eluição: gradiente linear desde 5% a 60% de eluente B
no eluente A, em 40 min

caudal: 1,8 ml/min

detector de U.V.: 254 nm

padrão interno: componente 2 de Teicoplanina A_2
(Gruppo Lepetit S.p.A.)

E) funções ácidas capazes de formar sais

F) funções amino capazes de formar sais

G) nenhuma unidade de manose ligada à metade do núcleo.

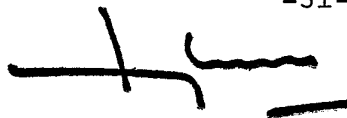
O factor A da N-acilaminoglucuronil-
-aglicona do antibiótico A 40926 (na forma de não-sal de
adição) tem as seguintes características:

A) espectro de absorção de ultravioletas com os seguintes
máximos de absorção:

	λ max (nm)
a) HCl 0,1 N	282
b) tampão fosfato pH 7,4	282
	310 (bossa)
c) KOH 0,1 N	302

B) espectro de absorção de infravermelhos com os seguintes
máximos de absorção (cm^{-1}):

3700-3000; 3000-2800; 1650; 1585; 1505; 1460 (nujol);
1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1070; 1060; 1010;
845; 820; 720 (nujol)



C) espectro de ^1H -RMN com os seguintes grupos de sinais (em ppm) a 270 MHz registados em DMSO d_6 (hexadeuterodimetil-sulfóxido), utilizando-se TMS como padrão interno (0,00 ppm), (δ = ppm):

0,85 t (CH_3 terminal); 1,0 + 1,3 ($\text{CH}'\text{s}$ alifáticos); 1,42 m (OC-CCH_2); 2,00 t ($(\text{CO})\text{CH}_2$); 2,35 s (NHC_3); 2,49 m (DMSOd_5); 2,82 m (Z2); 2,8 + 3,8 (protões de açúcar e Z'2); 4,12 m (X6); 4,56 s (X1); 4,34 d (X5); 4,41 d (X7); 4,96 m (X2); 5,08 - 5,12 (4f e Z6); 5,40 d (protão anomérico de ácido acilaminoglucurónico); 5,58 d (X4); 5,74 s (4b); 6,05 d (X3); 7,75 s (6b); 6,25-8,40 s, d e m ($\text{CH}'\text{s}$ aromáticos e $\text{NH}'\text{s}$ peptídicos)

D) Tempo de retenção (T_r) relativamente ao componente 2 de Teicoplanina A_2 ($T_r = 20,3$ min), quando analisado por CLAP de fase invertida, sob as seguintes condições:

coluna: Ultrasphere ODS. (5 μm) Altex (Beckman)
4,6 mm (d.i.) $\times$ 250 mm)

pré-coluna: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

eluyente A: CH_3CN	10%	} ajustado para pH 6,0
(2,5 g/l) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	90%	

eluyente B: CH_3CN	70%	} ajustado para pH 6,0
(2,5 g/l) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	30%	

eluição: gradiente linear desde 5% a 60% de eluyente B em eluyente A, em 40 min

caudal: 1,8 ml/min

detector de U.V.: 254nm

padrão interno: componente 2 de Teicoplanina A_2
(Gruppo Lepetit S.p.A.)

E) Peso molecular de cerca de 1554, conforme determinado

por EM-FAB

F) funções ácidas capazes de formar sais

G) função amino capaz de formar sais

H) nenhuma unidade de manose ligada à metade do núcleo.

O factor Bo da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 (na forma de não-sal de adição) tem as seguintes características:

A) espectro de absorção de ultravioletas com os seguintes máximos de absorção:

	λ_{max} (nm)
a) HCl 0,1 N	282
b) tampão fosfato pH 7,4	282
	310 (bossa)
c) KOH 0,1 N	302

B) espectro de absorção de infravermelhos com os seguintes máximos de absorção (cm^{-1}):

3700-3100; 3000-2800 (nujol); 1650; 1585; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1060; 1010; 980; 840; 820; 720 (nujol)

C) espectro de ^1H -RMN com os seguintes grupos de sinais (em ppm) a 270 MHz registados em DMSO d_6 (hexadeuterodimetilsulfóxido) utilizando-se TMS como padrão interno (0,00 ppm), (δ = ppm):

0,84, d (CH_3 's isopropílicos); 1,0 ÷ 1,3 (CH_2 's alifáticos); 1,3 ÷ 1,6 ((OC-C)- CH_2 e isopropílico-CH); 2,00 t ((OC) CH_2); 2,32 s (NCH_3); 2,49 e ($\text{DMSO}d_5$); 2,82 m (Z2); 2,9 ÷ 3,8 (prótons de açúcar); 4,12 m (X6); 4,44 s (X1); 4,33 d (X5); 4,37 d (X7); 4,95 m (X2); 5,06 ÷ 5,10 (4f e Z6); 5,38 d (próton anomérico de ácido acilaminoglucuró-

nico); 5,59 d (X4); 5,72 s (4b); 6,05 d (X3); 7,74 s 6b); 6,27 ÷ 8,5 (NH's aromáticos e peptídicos)

- D) Tempo de retenção (T_r) de 1,30 relativamente ao componente 2 da Teicoplanina A_2 ($T_r = 20,3$ min), quando analisado por CLAP de fase inversa sob as seguintes condições:

coluna: Ultrasphere ODS (5 μ m) Altex (Beckman)
4,6 mm (d.i.)x250 mm

pre-coluna: Laboratórios Brownlee RP 18 (5 μ m)

eluente A: CH_3CN 10% } ajustado para
(2,5 g/l) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 90% } pH 6,0

eluente B: CH_3CN 70% } ajustado
(2,5 g/l) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 30% } para pH 6,0

eluição: gradiente linear desde 5% a 60% de eluente B
B em eluente A, ao fim de 40 min

caudal: 1,8 ml/min

detector U.V.: 254 nm

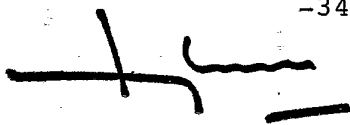
padrão interno: componente 2 de Teicoplanina A_2
(Gruppo Lepetit S.p.A.)

- E) Peso molecular de cerca de 1598 conforme determinado por EM-FAB

F) funções ácidas capazes de formar sais

G) funções amino capazes de formar sais

H) nenhuma unidade de manose ligada à metade do núcleo.



O factor B₁ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 (na forma de não-sal de adição) tem as seguintes características:

tem um peso molecular de cerca de 1568, conforme determinado por EM-FAB e tem praticamente as mesmas características físico-químicas referidas anteriormente para o factor B₀ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, excepto que tem um tripleto em 0,84 δ ppm atribuível ao grupo metilo duma função n-propilo no sistema de RMN referido anteriormente e um tempo de retenção relativamente ao componente 2 da Teicoplanina A₂ de 1,32 no sistema referido anteriormente.

As seguintes "preparações" são um exemplo das vias pelas quais o complexo da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e os seus factores podem ser preparados:

Preparação 1:

Preparação do complexo AB da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926

- a) o complexo AB do antibiótico A 40926 (preparado essencialmente pelo processo do Exemplo 3 da PE-A-177882) (750 mg) é dissolvido em 150 ml duma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO)/ácido clorídrico (HCl) a 37% (p/p), 9:1 (v/v) e a mistura reaccional é aquecida até cerca de 65°C.

O curso da reacção é monitorizado por CLAP e, após os materiais de partida terem reagido completamente (ao fim de cerca de 5 horas), a reacção é temperada com água fria (600 ml) e o pH da mistura resultante é ajustado para cerca de 7,5.

Esta mistura contém uma mistura dos compostos do título que é separada nos seus dois maiores componentes por cromatografia de afinidade, de acordo com o seguinte procedimento:

- b) A mistura aquosa obtida anteriormente (750 ml) é aplicada a uma coluna de cromatografia de Sepharose-D-Alanil-D-Alanina, preparada como descrito na PE-A-177882 e na PE-A-122969, Exemplo 1-A) (100 ml de resina inchada em tampão de pH 7,5 de 10 mM TRIS.HCl; altura de camada de 10 cm).

NH₄OH.HCl 0,05 M pH 7,5, contendo NaCl 2 M (200 ml) (tampão B), é passado através da coluna; depois o aglicon de A 40926 é removido selectivamente da coluna por eluição com NH₄OH.HCl 0,05 M pH 9,5 contendo NaCl 2 M (1500 ml) (tampão C).

O complexo AB de aglicon de N-acilaminoglucuronilo é então eluído com amónia aquosa 0,1 M (tampão D). As fracções eluídas são então agrupadas segundo o seu conteúdo antibiótico, o pH é ajustado para 7,5 e cada solução contendo antibiótico é cromatografada numa coluna de Sefarose-D-Alanil-D-Alanina (100 ml de resina inchada em tampão de Tris.HCl 10 mM pH 7,5; altura de camada de 10 cm). Passa-se água destilada através da coluna até se terem extraído por lavagem os sais inorgânicos. Os antibióticos são então eluídos com amóniaco aquoso 0,1N. Estas fracções eluídas, agrupadas segundo o seu conteúdo antibiótico, são concentradas para um volume pequeno sob pressão reduzida por destilação azeotrópica com n-butanol e liofilizadas, produzindo respectivamente 201 mg de complexo AB da N-acilaminoglucuronil-aglicona e 236 mg da aglicona de A 40926.

Por repetição da mesma experiência descrita anteriormente, mas utilizando uma mistura de DMSO/HCl a 37% 95:5, a cerca de 40°C, durante cerca de 5 dias, a produção do complexo AB de aglicon de N-acilaminoglucuronilo aumen-

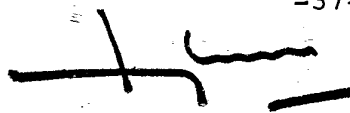
ta em cerca de 15%, enquanto que a produção da aglicona de A 40926 é reduzida na mesma medida.

Por repetição destas experiências a partir do complexo antibiótico A 40926, factor A do antibiótico A 40926, factor B do antibiótico A 40926, factor B₀ do antibiótico A 40926, factor B₁ do antibiótico A 40926, factor PA do antibiótico A 40926 e factor PB do antibiótico A 40926, obtêm-se praticamente os mesmos resultados (i.e. os rendimentos variam dentro dum intervalo de $\pm 5\%$). Em particular, se se partir do factor A ou factor PA do antibiótico A 40926, o produto que é obtido é o factor A da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, se se partir do factor PB₀, ou do factor B₀, do antibiótico A 40926 o produto obtido é o factor B₀ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, se se partir do factor B ou PB do antibiótico A 40926 o produto obtido é o factor B da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, o qual pode ser por sua vez separado no factor B₀ e B₁, e se se partir do factor B₁ do antibiótico A 40926 obtêm-se o factor B₁ de N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926.

Preparação 2

Separação dos factores A, B₀ e B₁ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926

20 mg do complexo AB da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 são dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato de sódio 18 mM pH 6,0 contendo 10% de acetonitrilo. A solução foi injectada numa coluna preparativa de CLAP (7 mm di $\times$ 250 mm), sílica gel silaniada Lichrosorb RP 18 (Merck Co.) com uma dimensão de partícula de 7 micrómetros.



A coluna é eluída com um caudal de 5 ml/min de fase A e B com um gradiente linear desde 10% até 55% de fase A em 55 min.

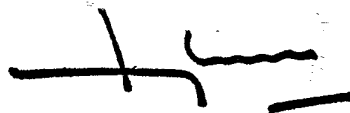
Fase A: fosfato de sódio 18 mM/CH₃/CN 30/70 trazido para pH 6,0 com NaOH.

Fase B: fosfato de sódio 18 mM/CH₃/CN 90/10 trazido para pH 6,0 como NaOH.

A absorção de UV dos eluatos da coluna a 254 nm é registada e as fracções de eluição com conteúdo homogéneo são recolhidas, separando-se três grupos de eluídos contendo respectivamente os factores A, B₀ e B₁ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926.

Os eluídos contendo os factores purificados da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 das 11 subseqüentes operações cromatográficas são reunidas e dessalificadas de forma normal por carregamento com os mesmos numa coluna de 5 ml de sefarose-D-Ala-D-Ala inchada (ver anteriormente). Após remoção dos sais com 10 ml de HCl 1 mM seguida por 5x10 ml de água destilada, o antibiótico é eluído com 5x10 ml de amoníaco aquoso a 1% p/v. Os eluídos de amoníaco são então recolhidos separadamente e secos por congelamento, produzindo-se 15 mg do factor A da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, 51 mg do factor B₀ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 e 3 mg do factor B₁ da N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, cujos dados físico-químicos e formula química são apresentados atrás na descrição.

Os exemplos seguintes ilustram adicionalmente o invento e, como tal, não devem ser entendidos como limitadores do seu âmbito.



Exemplo 1:

Fermentação de Actinoplanes teichomyceticus

Uma amostra duma cultura de reserva congelada de Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 é utilizada para inocular 100 ml de meio vegetativo com a seguinte composição:

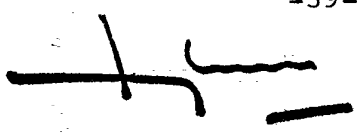
Glucose	10 g
Peptona	4 g
Extracto de levedura	4 g
MgSO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	4 g
Água desionizada	1000 g

100 ml do meio inoculado são incubados durante 48 horas num frasco Erlenmeyer de 500 ml a 28°C num agitador rotativo. Utilizando-se 200 ml desta cultura para inocular 4 l do meio de fermentação com a seguinte composição:

Peptona	4 g
Extracto de levedura	1 g
Farinha de soja	10 g
Extracto de malte	4 g
Glucose	5 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃	5 g
Água desionizada	1000 g

O meio inoculado é fermentado a cerca de 28°C sob 0,5 v/v/min dum fluxo de ar esterilizado a cerca de 900 rpm durante cerca de 48 horas.

A Actinoplanes teichomyceticus ATCC 53649 pode ser utilizada em vez de Actinoplanes teichomyce-



ticus ATCC 31121.

Exemplo 2:

Fermentação de Actinoplanes missouriensis ATCC 23342

Um tubo liofilizado contendo a estirpe Actinoplanes missouriensis ATCC 23342 é aberto e transferido assepticamente para um plano inclinado de agar de farinha de aveia. Após um período de incubação de 12 dias a 28°C, a cultura é suspensa em água destilada e inoculada em 10 frascos Erlenmeyer, contendo cada um 100 ml de meio com a seguinte composição:

Extracto de levedura	2 g
Farinha de soja	8 g
Dextrose	20 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	4 g
H ₂ O	1000 g

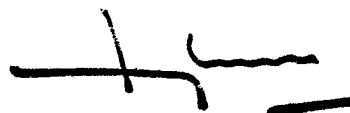
O meio inoculado é incubado durante 48 horas a 30°C num agitador rotativo a 200 rpm.

Pode-se utilizar Actinoplanes missouriensis NRRL 15646, NRRL 15647, ATCC 31683, ATCC 31682, ATCC 32680, ou uma sua mistura, em vez de Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, em qualquer proporção.

Exemplo 3:

Fermentação de Actinoplanes NRRL 3884

Um tubo liofilizado contendo a estirpe Actinoplanes NRRL 3884 é aberto e transferido assepticamente para um plano inclinado de agar de farinha de aveia.



Após 12 dias de incubação a 28°C, a cultura é suspensa em água destilada e inoculada em 10 frascos Erlenmeyer, contendo cada um 100 ml de meio com a seguinte composição

Extracto de levedura	2 g
Farinha de soja	8 g
Dextrose	20 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	4 g
H ₂ O	1000 g

O meio inoculado é incubado em 48 horas a 30°C num agitador rotativo a 200 rpm.

Exemplo 4

Preparação do antibiótico A 40926 de de-acilo

a) Biotransformação do complexo AB do antibiótico A 40926

O complexo AB do antibiótico A 40926 (preparado essencialmente como descrito na PE-A-177882) é adicionado assepticamente à cultura de fermentação preparada substancialmente como descrito no Exemplo 1, 2 ou 3, 48 horas após o inóculo. O processo de biotransformação é monitorizado por análise de CLAP do caldo. Os antibióticos de glicopeptídeo são purificados em Sefarose-D-Alanil-D-alanina (ver PE-A-122969) e são analisados de acordo com o seguinte método de CLAP:

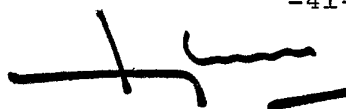
Coluna: Ultraesfera ODS (5 um) 4,6 mmx25 cm Altex (Beckman)

Pré-coluna: laboratório Brownlee RP 18 (5 um)

Fase A: tampão fosfato de sódio 18 mM/CH₃CN 98/2 (v/v)
levado para pH 6,0 com NaOH

Fase B: tampão fosfato de sódio 18 mM/CH₃CN 30/70 (v/v)
levado para pH 6,0 com NaOH

Eluição: gradiente linear desde 5% a 65% de fase B em 43 minutos



Caudal: 1,8 ml/min

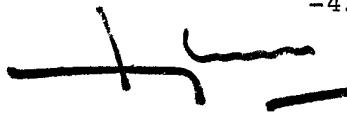
Deteção: UV 254 nm

O tempo de retenção do antibiótico A 40926 de de-ácilo varia entre 8,3 e 9.

O tempo de colheita é fixado em cerca de 196 horas após a adição do complexo AB do antibiótico A 40926 ao meio para Actinoplanes NRRL 3884, em cerca de 168 horas para Actinoplanes missouriensis ATCC 23342, ATCC 31683, ATCC 31682, ATCC 32680, NRRL 15646 e NRRL 15647 e cerca de 192 horas para Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 e ATCC 53649. A eficiência de desacilação é praticamente igual para qualquer das culturas anteriores.

b) Recolha e purificação

O caldo colhido obtido dos frascos Erlenmeyer em conjunto é levado para pH 9,5 com NaOH e é filtrado com um auxiliar de filtração Hyflo-FloMa. O bolo de filtração é descarregado, ao mesmo tempo que o pH do filtrado transparente é ajustado para pH 7,5 com HCl. 10 ml de Sefarose-D-Alanil-D-Alanina inchada (ver atrás) são adicionados e esta mistura é agitada durante a noite à temperatura ambiente. A resina é então recolhida por filtração e lavada sequencialmente sobre o filtro com 4x40 ml de tampão TRIS.HCl 40 mM (pH 6,5) / 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propanodiol¹⁷ e 6x40 ml de água destilada. Então, uma mistura é eluída da resina com 3x40 ml de NH₄OH aquoso a 1% (p/v). Esta solução é arrefecida até cerca de 4°C e levada para pH 3,5 com H₂SO₄. O precipitado é removido por centrifugação, enquanto que o sobrenadante que mantém o antibiótico A 40926 biotransformado numa solução (150 ml) é levado para pH 7,0 com NaOH e é carregado numa coluna (diâmetro 1 cm) contendo 25 ml de Sefarose-D-Alanil-D-Alanina inchada em água destilada. A coluna é eluída sequencialmente com 50 ml de água destilada e



200 ml de etanol/água 1/9 (v/v). A substância antibiótica do título é então eluída com 35 ml de NH_4OH aquoso a 1% (p/v). Esta solução é concentrada sob vácuo e depois é seca por congelamento produzindo 41-45 mg do antibiótico A 40926 de de-acilo. As características físico-químicas são referidas atrás na descrição.

Repetindo-se o mesmo processo, mas partindo-se do factor A do antibiótico A 40926 ou do factor B ou B_0 do antibiótico A 40926, obtem-se o mesmo composto com produções similares.

Exemplo 5

Preparação de aglicon de aminoglucuronilo do antibiótico A 40926

Se se repetir o processo do exemplo 4, partindo-se do complexo AB de aglicon de N-acilaminoglucuronilo do antibiótico A 40926, do factor A, factor B, factor B_0 ou B_1 de aglicon de N-acilaminoglucuronilo do antibiótico A 40926 (preparados da forma descrita anteriormente), obtem-se o aglicon de aminoglucuronilo do antibiótico A 40926, que tem as características referidas anteriormente na descrição.

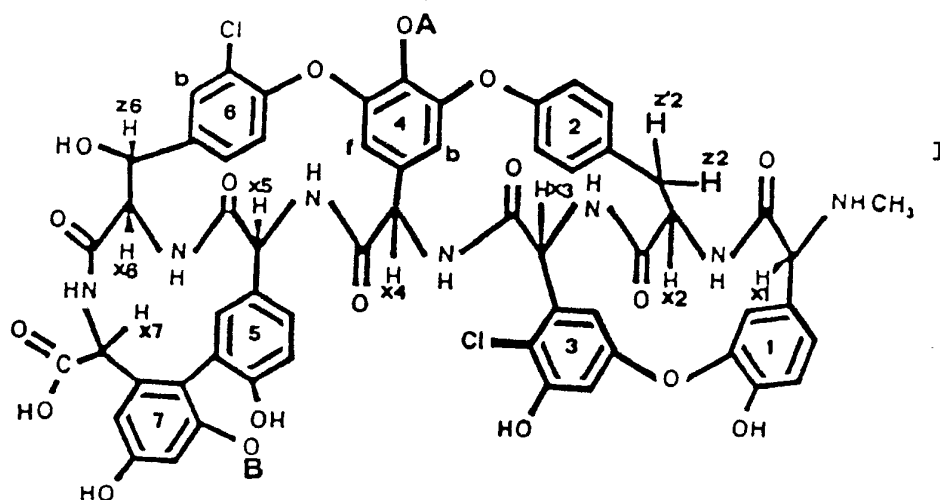
Exemplo 6

Preparação do antibiótico A 40926 de de-acilo

Repetindo-se o processo do exemplo 4, mas partindo-se do factor PA ou PB do antibiótico A 40926, ou duma sua mistura em qualquer proporção, e reduzindo para um mínimo a permanência da massa da reacção em valores de pH básico, obtem-se o antibiótico A 40926 P de de-acilo, cujas características são como definidas anteriormente.

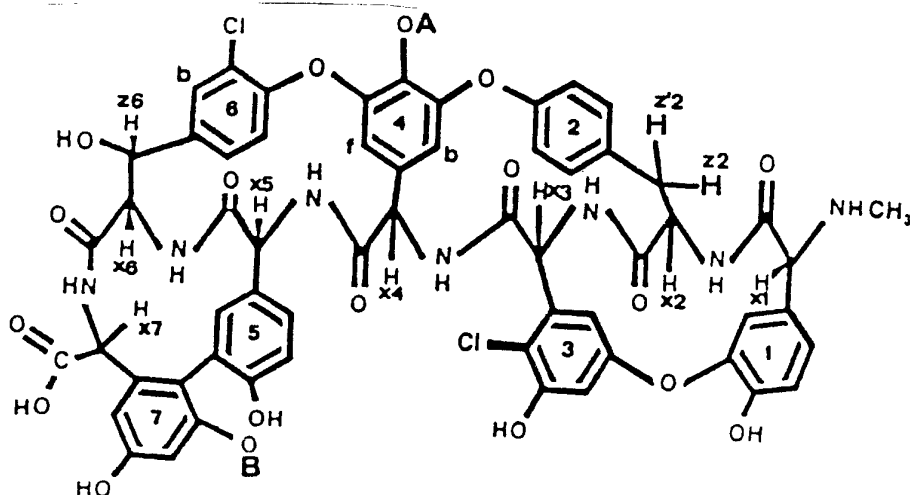
REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo para a preparação do antibiótico desacil-A 40926 de fórmula:



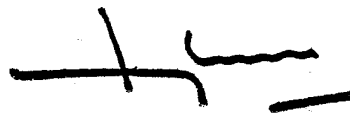
na qual

A representa um grupo ácido 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucopiranosidurónico e B representa hidrógeno, alfa-D-manopiranosilo ou 6-acetil-alfa-D-manopiranosilo, e dos seus sais de adição, caracterizado por compreender o tratamento dum composto de fórmula:



na qual A representa um grupo ácido 2-desoxi-2-(C₁₁-C₁₂)acil-amino-beta-D-glucopiranosidurónico e B representa hidrogénio, alfa-D-manosilo ou 6-acetil-alfa-D-manosilo, dum seu sal de adição e/ou duma sua mistura em qualquer proporção, com uma cultura de crescimento duma estirpe do género *Actinoplanes*.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a estirpe do género *Actinoplanes* ser seleccionada entre *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121, *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 53649, *Actinoplanes* NRRL 3884, *Actinoplanes missouriensis* ATCC 23342, *Actinoplanes missouriensis* NRRL 15646, *Actinoplanes missouriensis* NRRL 15647, *Actinoplanes missouriensis* ATCC 31683, *Actinoplanes missouriensis* ATCC 31682, *Actinoplanes missouriensis* ATCC 32680 e um mutante ou variante da mesma que retém a capacidade de desacilação da estirpe mãe.



3a. - Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2 caracterizado por se utilizar um micélio lavado, um extracto ou concentrado livre de células em vez duma cultura de crescimento do microorganismo de desacilação.

4a. - Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3 caracterizado por a temperatura de reacção se situar entre 20°C e 40°C.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por a temperatura de reacção se situar entre 25°C e 50°C.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar o antibiótico desacil-A 40926, ou um seu sal de adição, com as seguintes características, na forma do não sal de adição:

A) espectro de absorção de ultravioletas com os seguintes máximos de absorção:

	λ_{max} (nm)
a) HCl 0,1 M	282
b) tampão fosfato pH 6,0	281
c) tampão fosfato pH 7,4	282,300 (bossa)
d) KOH 0,1 M	300

B) espectro de absorção de infravermelhos com os seguintes máximos de absorção em pasta Nujol ($\sqrt{\text{cm}^{-1}}$):
 3700-3100; 3000-2800 (nujol); 1650; 1590; 1505; 1460 (nujol);
 1375 (nujol); 1300; 1230; 1210; 1150; 1060, 1030, 970, 810,
 720 (nujol)

C) espectro de ^1H -RMN com os seguintes grupos de sinais (em ppm) a 270 MHz registados em DMSO d_6 (hexadeutero-dimetilsul-

fóxiado) δ , ppm; m; (atribuições) 7
 2,30, s (N-CH₃); 2,49, s (DMSOd₅); 2,7-3,8, m
 (CH's de açúcar); 2,79 m (Z2); 4,08 m (X6); 4,33 s
 (X1); 4,37 d (X5); 4,37 d (X7); 4,86 m (X2); 5,08 s
 (4f); 5,08 s (Z6); 5,27 s (protão anomérico de manose);
 5,35 d (protão anomérico de ácido aminoglucurónico); 5,61 d
 (X4); 5,86 s (4b); 6,05, d (X3); 7,73 s (6b); 6,45-8,49
 (protões aromáticos e NH's peptídicos)

D) tempo de retenção (R_t) de 0,34 relativamente à Vancomicina (Eli Lilly) Coluna: sílica gel silanizada Ultrasphere ODS (5 μ m) 4,6 mmx25 cm Altex (Beckman) Eluição isocrática com tampão de fosfato de sódio 18 mM/CH₃CN 92/8 (v/v)
 Caudal: 1,8 ml/min
 Detecção: UV 254 nm
 Padrão interno: Vancomicina (Eli Lilly)
 Rt 8,4 min

E) peso molecular de 1548 conforme determinado por espectroscopia BAR-EM.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar o aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, em que A é como definido para o composto de fórmula I e 8 representa hidrogénio, ou um seu sal de adição.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar o antibiótico desacil-A 40926, em que A é como definido para a fórmula I e B representa 6-acetil-alfa-D-manosilo, ou um seu sal de adição.

9a. - Processo de acordo com a rei-

vindicação 1 caracterizado por se preparar o antibiótico desacil-A 40926, em que A é como definido para a fórmula I e B representa alfa-D-manosilo, ou um seu sal de adição.

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar o antibiótico desacil-A 40926 a partir do complexo antibiótico A 40926, factor A, B ou B_O.

11a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar o aminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926 a partir do complexo de N-acilaminoglucuronil-aglicona do antibiótico A 40926, factor A, B ou B_O.

12a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se incluir na referida composição um composto produzido de acordo com as reivindicações 1 a 10, em mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável.

13ª. - Método para a utilização em medicina de um composto de fórmula I, nomeadamente como antimicrobiano, caracterizado por se aplicar o referido composto, obtido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11, a um paciente, numa gama de dosagem de 0,5 a 50 mg por quilograma de peso corporal por dia.

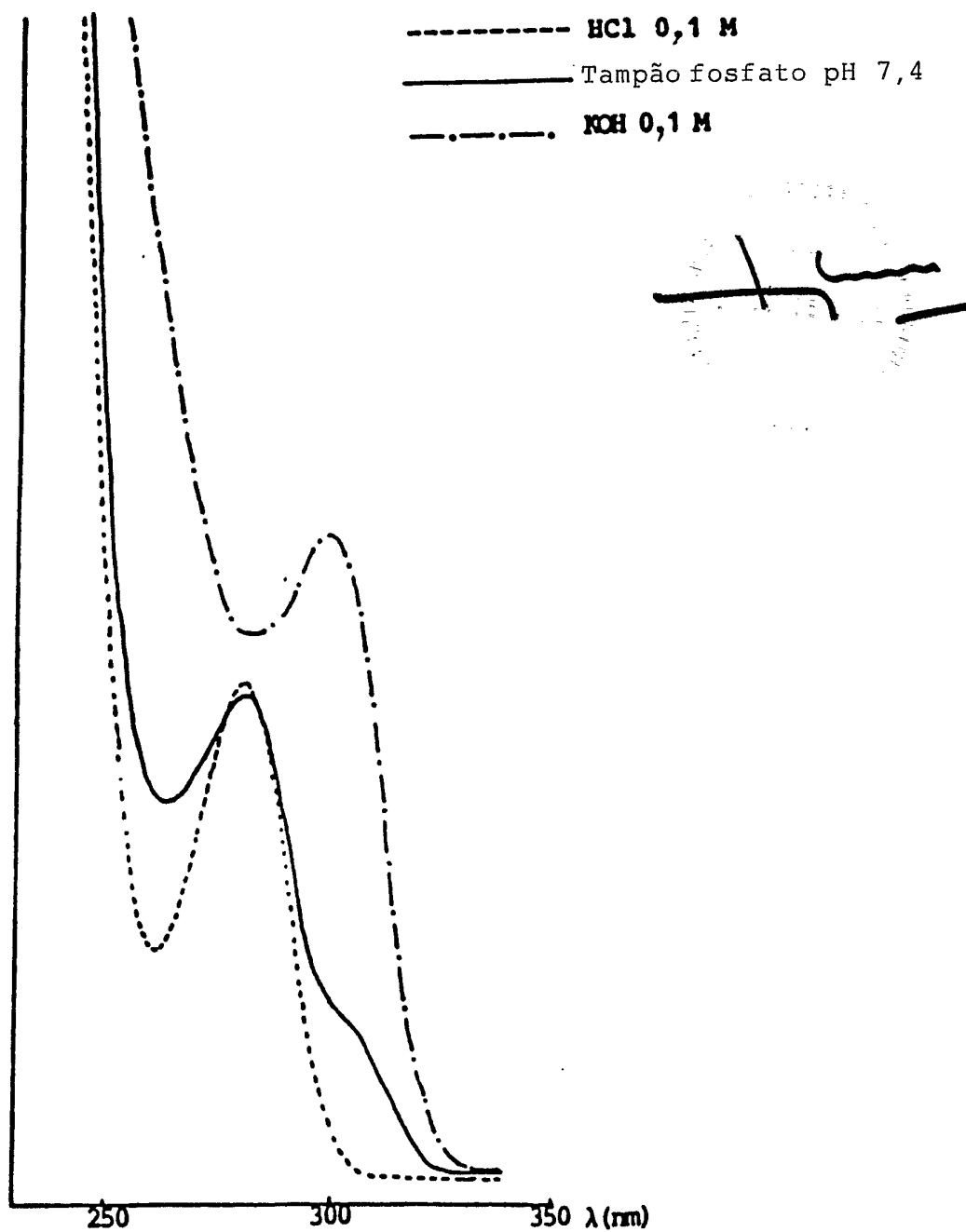
Lisboa, 8 de Outubro de 1987



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

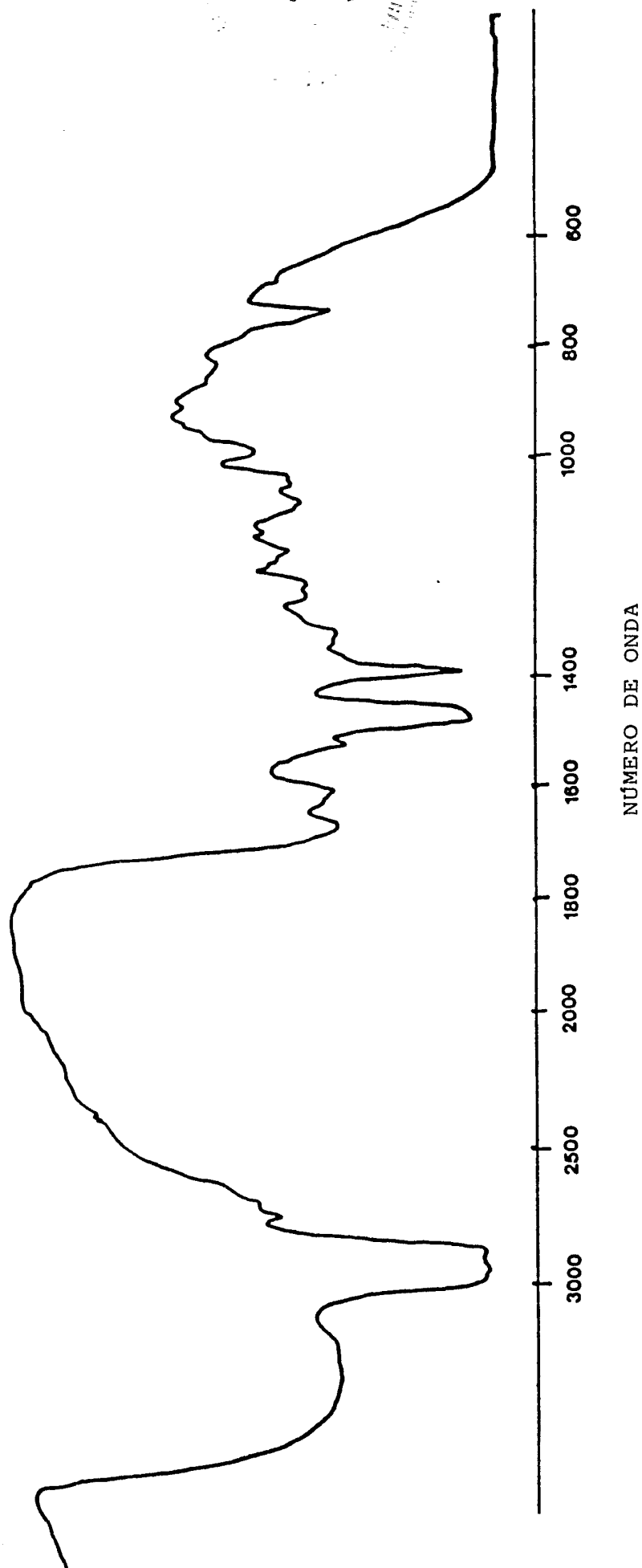
ESPECTRO DE U.V. DO ANTIBIÓTICO A 40926 DE DE-ACILO

FIG. 1



ESPECTRO DE I.V.DO ANTIBIOTICO A 40926 DE DE-ACILO

FIG. 2



ESPECTRO DE ^1H -R.M.N. DO ANTIBIOTICO A 40926 DE DE-ACILO

FIG. 3

