



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0719978-3 A2



* B R P I 0 7 1 9 9 7 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 25/09/2007
(43) Data da Publicação: 12/08/2014
(RPI 2275)

(51) Int.Cl.:
C07K 14/36
C07K 7/08
C12P 21/02
A61P 31/12
A61P 31/04
A61K 38/10

(54) Título: PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E ANTIVIRAIS DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 06/10/2006 EP 06 020980.6

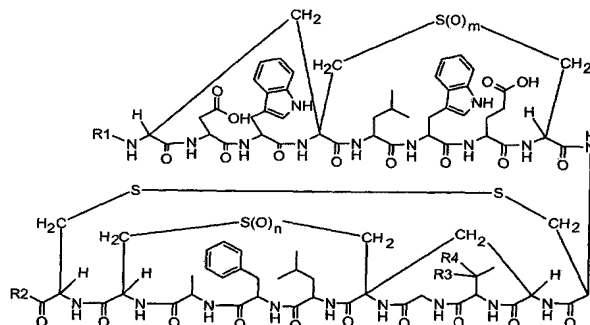
(73) Titular(es): Sanofi-Aventis

(72) Inventor(es): George Sheldrick, Gerhard Seibert, Hans Guehring, Holger Hoffmann, Irvin Winkler, Joachim Wink, Kathrin Meindl, Luigi Toti, LÁSZLÓ VÉRTESY, Mark Broenstrup, Roderich Süssmuth

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007008294 de 25/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/040469de 10/04/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E ANTIVIRAIS DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS**".

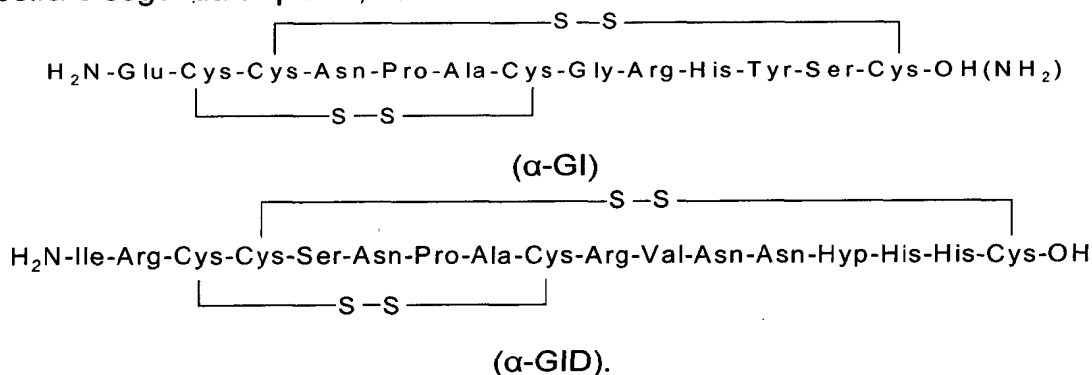
Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se aos novos peptídeos isolados de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), a um método para sua preparação e a seu uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de infecções bacterianas, para o tratamento de infecções virais e/ou para o tratamento de dor.

10 Antecedentes da Invenção

Vários peptídeos altamente em ponte são conhecidos na literatura, por exemplo, conopeptídeos isolados de moluscos em cone (para uma revisão, veja, por exemplo, Terlau e Olivera, *Physiol. Rev.* 2004, 84, 41–68), ou os denominados lantibióticos (Chatterjee *et al*, *Chem. Rev.* 2005, 105, 633-683) originados de bactérias Gram-positivas. Os referidos peptídeos possuem várias utilidades. O lantibiótico nisina tem sido usado, entre outras utilidades, como conservante de alimentos há muitos anos.

Os conopeptídeos são, por exemplo, úteis no tratamento de dor, diabetes, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares, e atualmente estão em desenvolvimento pré-clínico ou clínico. Exemplos de conopeptídeos são α -GI (sequência: ECCNPACGRHYSC*, *amidada, conectividade: 1-3,2-4) e α -GID (sequência: IR γ CCSNPACRVNNOHVVC, conectividade: 1-3,2-4), em que O/Hyp é hidroxiprolina e a conectividade indica a posição da cisteína envolvida em cada ligação dissulfeto específica, por exemplo, primeira a terceira e segunda a quarta, como em α -GID:

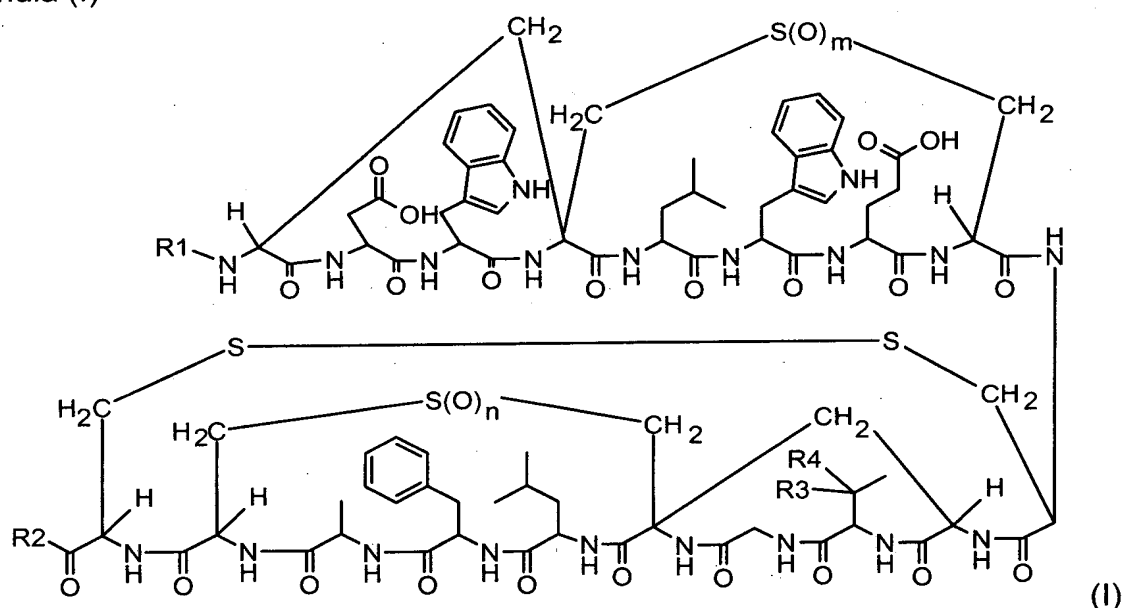


Sumário da Invenção

Verificou-se agora surpreendentemente que peptídeos altamente em ponte podem ser isolados de uma cepa do micro-organismo *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) e são úteis para o tratamento de infecções bacterianas, infecções virais e/ou dor.

Descrição Detalhada da Invenção

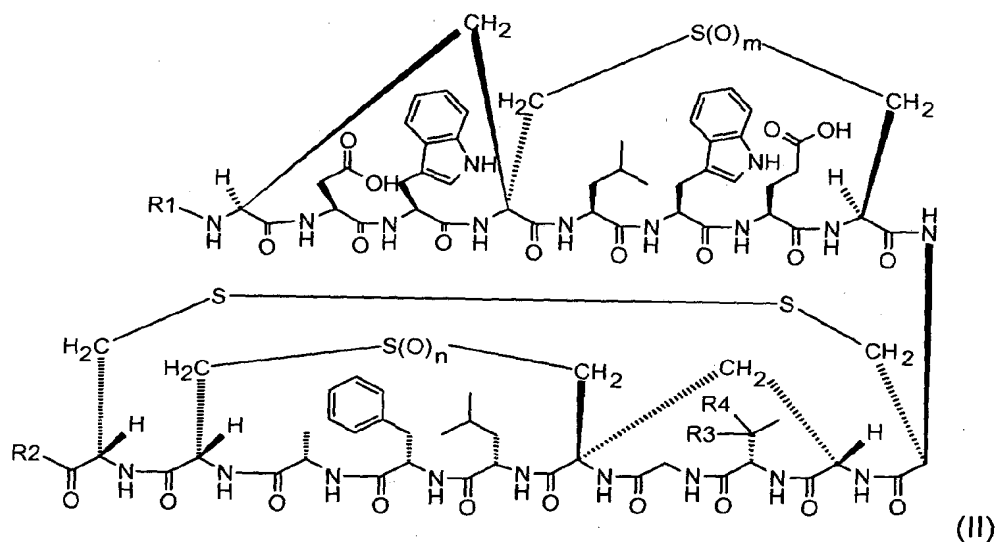
Uma modalidade da presente invenção é um composto da fórmula (I)



em que:

- 10 R1 é H, C(O)-(C₁-C₆)alquila ou C(O)-O-(C₁-C₆)alquila;
 R2 é OH, NH₂, NH-(C₁-C₆)alquila, NH-(C₁-C₄)alquileno-fenila ou NH-(C₁-C₄)alquileno-piridila;
 R3 e R4, independentemente um do outro, são H ou OH, ou R3 e R4 juntos são =O; e
 15 m e n são, independentemente um do outro, 0, 1 ou 2;
 em qualquer forma estereoquímica, ou uma mistura de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou um sal fisiologicamente tolerável destas.

20 Em uma modalidade adicional, o composto da fórmula (I) é caracterizado por um composto da fórmula (II)



em que R1, R2, R3, R4, m e n são como definidos acima.

R1 é, de preferência, H. R2 é, de preferência, OH. R3 e R4 são, de preferência, H ou OH, em que, se R3 for OH, então R4 será H, e se R3 for H, então R4 será OH, ou R3 e R4 juntos são =O. De preferência, R3 e R4 são H ou OH, em que, se R3 for OH, então R4 será H, e se R3 for H, então R4 será OH.

De preferência, m e n são 0, ou m e n são 2, ou m é 0 e n é 2, ou m é 2 e n é 0. Prefere-se, principalmente, que m e n sejam ambos 0.

Uma modalidade adicional da presente invenção é um composto da fórmula (I) ou da fórmula (II), em que:

R1 é H;

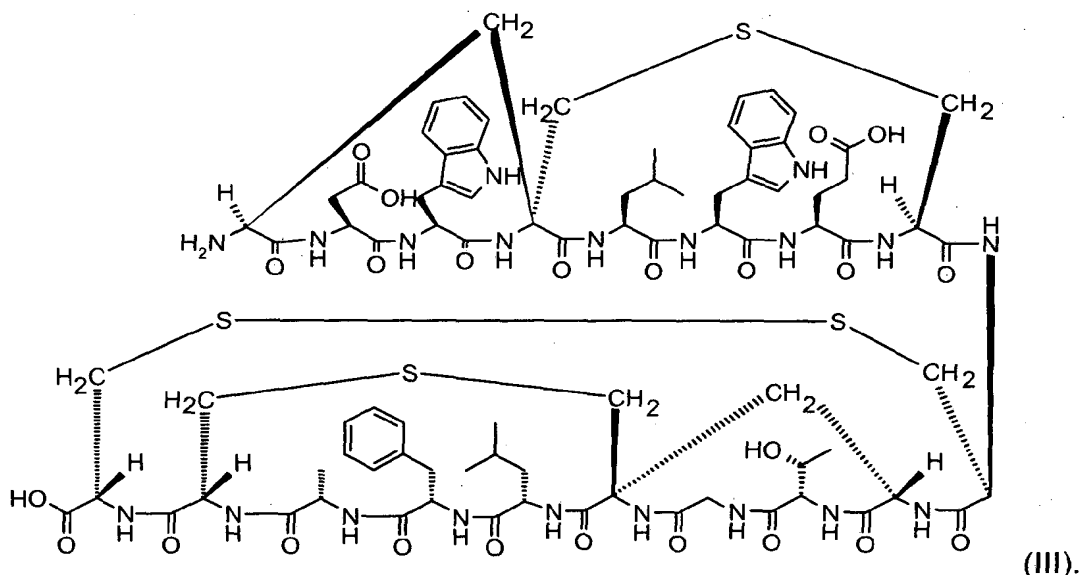
R2 é OH;

R3 e R4 são H ou OH, em que, se R3 for OH, então R4 será H, e se R3 for H, então R4 será OH; e

m e n são, independentemente um do outro, 0, 1 ou 2, de preferência m e n são 0, ou m e n são 2, ou m é 0 e n é 2, ou m é 2 e n é 0, preferindo-se particularmente que m e n sejam ambos 0;

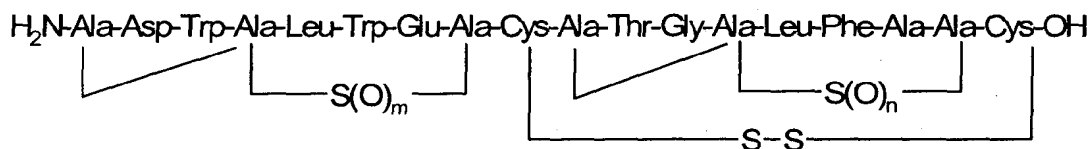
ou um sal fisiologicamente tolerável destes.

De preferência, o composto (I) é caracterizado por um composto da fórmula (III)



Para uma caracterização adicional dos compostos da presente invenção, os resíduos do peptídeo foram convertidos de volta em seus precursores prováveis da síntese peptídica ribossômica. Os aminoácidos alfa, alfa-dissubstituídos nos resíduos 1 e 10 não têm precedentes na literatura.

- 5 O referido aminoácido pode ser descrito como um resíduo Ala em ponte por um grupo metileno e substituído na posição beta, como mostrado abaixo:



- A presente invenção ainda está relacionada a todos os equivalentes químicos óbvios dos compostos das fórmulas (I), (II) e (III) de acordo com a invenção. Esses equivalentes são compostos que exibem somente uma ligeira diferença química, e possuem o mesmo efeito farmacológico, ou
- 10 que são convertidos nos compostos de acordo com a invenção sob condições suaves. Os referidos equivalentes também incluem, por exemplo, sais, produtos de redução, produtos de oxidação, ésteres de processos hidrolíticos parciais, éteres, acetais ou amidas dos compostos das fórmulas (I), (II) e
- 15 (III), além de equivalentes que aqueles versados na técnica podem preparar com o uso de métodos-padrão e, além disso, todos os antípodas e diastereômeros ópticos e todas as formas estereoisoméricas.

A menos que indicado de forma diferente, os centros quirais nos

compostos da fórmula (I) podem estar presentes na configuração R ou na configuração S. A invenção está relacionada tanto aos compostos opticamente puros quanto às misturas estereoisoméricas como, por exemplo, misturas enantioméricas e misturas diastereoméricas.

5 Entende-se que sais fisiologicamente tolerados de compostos das fórmulas (I), (II) e (III) são tanto seus sais orgânicos quanto seus sais inorgânicos, como descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" (17ª edição, página 1418 (1985)). Em função de sua estabilidade física e química e de sua solubilidade, sais de sódio, potássio, cálcio e amônio são preferi-
10 dos, *inter alia*, para grupos ácidos; sais de ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, ou de ácidos carboxílicos ou ácidos sulfônicos como, por exemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico e ácido p-toluenossulfônico, são preferidos, *inter alia*, para grupos básicos.

15 Os compostos da presente invenção foram denominados Labirintopeptinas por todo o texto.

A invenção também está relacionada a um processo para a preparação de um composto da fórmula (I), em que: m e n são, independentemente um do outro, 0, 1 ou 2, que compreende:

20 a) a cepa de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), ou uma de suas variantes e/ou mutantes, sendo fermentadas sob condições adequadas em um meio de cultura, até que um ou mais dos compostos da fórmula (I) se acumulem no meio de cultura,

b) um composto da fórmula (I) sendo isolado do meio de cultura,
25 e

c) o composto da fórmula (I) sendo derivatizado, quando apropriado, e/ou, quando apropriado, sendo convertido em um sal fisiologicamente tolerado.

De preferência, a invenção está relacionada a um processo para
30 a preparação de um composto da fórmula (I), em que o composto (I) é caracterizado por um composto da fórmula (II), mais preferivelmente, a invenção está relacionada a um processo para a preparação de um composto da fór-

mula (I) ou preferido (II), em que: m e n são 0, ou m e n são 2, ou m é 0 e n é 2, ou m é 2 e n é 0.

De preferência, particularmente a invenção está relacionada a um processo para a preparação de um composto da fórmula (I), em que: o
5 composto (I) é caracterizado por um composto da fórmula (III).

O meio de cultura é uma solução nutriente ou um meio sólido que contém pelo menos uma fonte convencional de carbono e pelo menos uma fonte de nitrogênio, além de um ou mais sais inorgânicos convencionais.

10 O processo de acordo com a invenção pode ser usado para a fermentação em uma escala laboratorial (escala de mililitros a litros) e para a fermentação em uma escala industrial (escala de metros cúbicos).

Fontes de carbono adequadas para a fermentação são carboidratos assimiláveis e alcoóis de açúcar como, por exemplo, glicose, lactose,
15 sacarose ou D-manitol, bem como produtos naturais que contêm carboidratos, tais como extrato de malte ou extrato de levedura. Exemplos de nutrientes que contêm nitrogênio são aminoácidos; peptídeos e proteínas, e também seus produtos de degradação, por exemplo, caseína, peptonas ou triptonas; extratos de carne; extratos de levedura; glúten; sementes moídas, por
20 exemplo, de milho, trigo, grãos, soja ou da planta do algodão; resíduos da destilação da produção de álcool; rações de carne; extratos de levedura; sais de amônio; nitratos. Prefere-se que a fonte de nitrogênio seja um ou mais peptídeos que tenham sido obtidos de forma sintética ou biossintética. Exemplos de sais inorgânicos são cloretos, carbonatos, sulfatos ou fosfatos
25 dos metais alcalinos, dos metais alcalino-terrosos, ferro, zinco, cobalto e manganês. Exemplos de microelementos são cobalto e manganês.

Condições que são especialmente adequadas à formação das Labirintopeptinas de acordo com a invenção são as seguintes: de 0,05 a 5%, de preferência de 0,1 a 2,5%, de extrato de levedura; de 0,2 a 5,0%, de preferência de 0,1 a 2%, de casitona; de 0,02 a 1,0%, de preferência de 0,05 a
30 0,5%, de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; de 0,02 a 1,5%, de preferência de 0,05 a 0,7%, de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ e de 0,00001% a 0,001% de cianocobalamina. Os valores

de percentagens que são fornecidos são, em cada caso, baseados no peso da solução nutriente total.

O micro-organismo é cultivado aerobicamente, ou seja, por exemplo, submerso durante agitação ou movimentação em frascos de agitação ou fermentadores, ou em meio sólido, quando apropriado, enquanto ar ou oxigênio está sendo passado em seu interior. O micro-organismo pode ser cultivado em uma faixa de temperatura a partir de cerca de 18 a 35°C, de preferência, de cerca de 20 a 32°C, em particular, de 27 a 30°C. A faixa de pH deve estar entre 4 e 10, de preferência entre 6,5 e 7,5. O micro-organismo é geralmente cultivado sob essas condições por um período de 2 a 10 dias, de preferência de 72 a 168 horas. O micro-organismo é cultivado vantajosamente em várias etapas, isto é, uma ou mais culturas preliminares são inicialmente preparadas em um meio nutriente líquido, com essas culturas preliminares sendo então inoculadas no verdadeiro meio de produção, isto é, a cultura principal, por exemplo, em uma proporção por volume de 1:10 a 1:100. A cultura preliminar é obtida, por exemplo, por inoculação da cepa, na forma de células vegetativas ou esporos, em uma solução nutriente, e permitindo-se que ela cresça por cerca de 20 a 120 horas, de preferência por cerca de 48 a 96 horas. As células vegetativas e/ou os esporos podem ser obtidos, por exemplo, permitindo-se que a cepa cresça por cerca de 1 a 15 dias, de preferência de 4 a 10 dias, em um substrato nutriente sólido ou líquido, por exemplo, ágar de levedura.

Os derivados de Labirintopectina podem ser isolados e purificados do meio de cultura com o uso de métodos conhecidos e considerando-se as propriedades químicas, físicas e biológicas das substâncias naturais. A HPLC foi usada para testar as concentrações dos respectivos derivados de Labirintopectina no meio de cultura ou nas etapas individuais de isolamento, com a quantidade da substância formada de forma eficaz sendo comparada com uma solução de calibração.

Para o isolamento, o caldo de cultura, ou a cultura juntamente com o meio sólido, é opcionalmente liofilizado, e os derivados de Labirintopectina são extraídos do liofilizado com a utilização de um solvente orgânico

ou uma mistura de água e um solvente orgânico, de preferência contendo 50-90% de solvente orgânico. Exemplos de solventes orgânicos são metanol e 2-propanol. A fase de solvente orgânico contém as substâncias naturais de acordo com a invenção; ela é concentrada, quando apropriado, em vácuo, e submetida à purificação adicional.

A purificação adicional de um ou mais compostos de acordo com a invenção é efetuada por cromatografia em materiais adequados, de preferência, por exemplo, em peneiras moleculares, em sílica-gel, em óxido de alumínio, em permutadores de íons ou em resinas adsorventes ou em fases reversas (RPs). Essa cromatografia é usada para separar os derivados de Labirintopectina. Os derivados de Labirintopectina são submetidos à cromatografia com a utilização de soluções aquosas tamponadas, básicas ou acidificadas, ou misturas de soluções aquosas e orgânicas.

Entende-se que misturas de soluções aquosas ou orgânicas são, todas, solventes orgânicos miscíveis na água, de preferência metanol, 2-propanol ou acetonitrila, em uma concentração de 5 a 99% de solvente orgânico, de preferência de 5 a 50% de solvente orgânico ou, além disso, todas as soluções aquosas tamponadas que sejam miscíveis com solventes orgânicos. Os tampões que devem ser usados são os mesmos que os especificados acima.

Os derivados de Labirintopectina são separados com base em suas polaridades diferentes, por meio de cromatografia de fase reversa, por exemplo, em MCI (resina adsorvente, Mitsubishi, Japão) ou Amberlite XAD (TOSHAAS), ou em outros materiais hidrofóbicos, por exemplo, em fases RP-8 ou RP-18. Além disso, a separação pode ser efetuada por meio de cromatografia de fase normal, por exemplo, em sílica-gel, óxido de alumínio, e similares.

Entende-se que soluções aquosas tamponadas, básicas ou acidificadas são, por exemplo, água, tampão de fosfato, acetato de amônio e tampão de citrato, em uma concentração de até 0,5 M, bem como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoracético, amônia e trietilamina, ou todos os ácidos e bases disponíveis comercialmente conhecidos por aqueles versa-

dos na técnica, de preferência em uma concentração de até 1%. No caso de soluções aquosas tamponadas, é dada preferência particular ao acetato de amônio 0,1%.

5 A cromatografia pode ser realizada com o uso de um gradiente que começava com 100% de água e terminava com 100% de solvente orgânico; a cromatografia foi executada, de preferência, com um gradiente linear de 5 a 95% de acetonitrila.

10 Alternativamente, também é possível realizar uma cromatografia em gel ou cromatografia em fases hidrofóbicas. A cromatografia em gel, por exemplo, pode ser efetuada em géis de poliacrilamida ou géis de copolímero. A sequência das etapas cromatográficas mencionadas acima pode ser invertida.

15 Na medida em que as Labirintopeptinas estejam presentes como estereoisômeros, elas podem ser separadas com a utilização de métodos conhecidos, por exemplo, por meio de separação com o uso de uma coluna quiral.

20 A derivatização do grupo OH em um derivado éster ou éter é efetuada com o uso de métodos que são conhecidos *per se* (J. March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley & Sons, 4ª edição, 1992), por exemplo, por meio da reação com um anidrido ácido, ou por reação com um carbonato de dialquila ou sulfato de dialquila. A derivatização do grupo COOH em um derivado éster ou amida é efetuada com o uso de métodos que são conhecidos *per se* (J. March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley & Sons, 4ª edição, 1992), por exemplo, por meio da reação com amônia até o
25 respectivo grupo CONH₂, ou com um composto alquila opcionalmente ativado no respectivo éster de alquila. A oxidação de grupos -CH₂-S-CH₂- em um grupo -CH₂-S(O)-CH₂- ou em um grupo -CH₂-S(O)₂-CH₂- pode ser obtida mediante exposição do respectivo derivado de Labirintopeptina ao oxigênio ou ao ar.

30 Um isolado da cepa do micro-organismo *Actinomadura namibiensis* foi depositado sob a referência de identificação FH-A 1198 no "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" ["German Collection

of Micro-organisms and Cell Cultures"] GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Alemanha, de acordo com as regras do tratado de Budapeste, em 23 de janeiro de 1991 sob o seguinte número: DSM 6313. A cepa do micro-organismo *Actinomadura namibiensis* é ainda descrita por Wink *et al* no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53, 721-724.

Em vez da cepa de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), também é possível usar seus mutantes e/ou variantes que sintetizam um ou mais compostos de acordo com a invenção.

Um mutante é um micro-organismo no qual um ou mais genes no genoma foi modificado, com o gene, ou os genes, que são responsáveis pela habilidade do organismo para produzir o composto de acordo com a invenção, permanecendo funcional e hereditário.

Esses mutantes podem ser produzidos, de uma forma conhecida *per se*, com o uso de meios físicos, por exemplo, irradiação, por exemplo, com raios ultravioletas ou raios X, por mutágenos químicos, por exemplo, metanossulfonato de etila (EMS); 2 hidróxi-4-metoxibenzofenona (MOB) ou N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), ou como descrito por Brock *et al* em "Biology of Micro-organisms", Prentice Hall, páginas 238-247 (1984).

Uma variante é um fenótipo do micro-organismo. Micro-organismos possuem a habilidade para se adaptar ao seu ambiente e, portanto, exibir flexibilidade fisiológica altamente desenvolvida. Todas as células do micro-organismo estão envolvidas na adaptação fenotípica, com a natureza da alteração não estando geneticamente condicionada e sendo reversível sob condições alteradas (H. Stolp, *Microbial ecology: organism, habitats, activities*. Cambridge University Press, Cambridge, GB, página 180, 1988).

A separação de mutantes e/ou variantes que sintetizam um ou mais compostos de acordo com a invenção é obtido liofilizando-se opcionalmente o meio de fermentação e extraíndo-se o liofilizado ou o caldo de fermentação com um solvente orgânico ou uma mistura de água e um solvente orgânico, como definido acima, e analisando-se por meio de HPLC ou TLC ou por teste da atividade biológica.

As condições de fermentação podem ser aplicadas a *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) e para mutantes e/ou variantes deste.

Uma modalidade adicional da presente invenção é o uso de um composto da fórmula (I), de preferência um composto da fórmula (II) ou (III),
5 como definidos acima, para o tratamento de infecções bacterianas, especialmente infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-positivas, para o tratamento de infecções virais e/ou para o tratamento de dor, especialmente dor neuropática ou dor de origem inflamatória.

O medicamento descrito acima (também, denominado preparação farmacêutica ou composição farmacêutica) contém uma quantidade eficaz de pelo menos um composto da fórmula (I), em qualquer forma estereoquímica, ou uma mistura de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou um sal fisiologicamente tolerável ou equivalente químico deste, como descrito acima, e pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável,
15 tável, de preferência uma ou mais substâncias transportadoras (ou veículos) e/ou aditivos (ou excipientes) farmaceuticamente aceitáveis.

O medicamento pode ser administrado por via oral, por exemplo, na forma de pílulas, comprimidos, comprimidos laqueados, comprimidos revestidos, grânulos, cápsulas de gelatina dura e macia, soluções, xaropes,
20 emulsões, suspensões ou misturas em aerossol. A administração, no entanto, também pode ser realizada por via retal, por exemplo, na forma de supositórios, ou parenteralmente, por exemplo, por via intravenosa, intramuscular ou subcutânea, na forma de soluções para injeção ou soluções para infusão, microcápsulas, implantes ou bastonetes, ou por via percutânea ou tópica,
25 por exemplo, na forma de pomadas, soluções ou tinturas, ou em outras formas, por exemplo, na forma de aerossóis ou sprays nasais.

Os medicamentos de acordo com a invenção são preparados de uma forma conhecida *per se* e familiar por aqueles versados na técnica, sendo usadas substâncias transportadoras e/ou aditivos inorgânicos e/ou
30 orgânicos inertes farmaceuticamente aceitáveis, além do(s) composto(s) das fórmulas (I) em qualquer forma estereoquímica, ou uma mistura de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou um sal fisiologica-

mente tolerável ou equivalente químico deste, como descrito acima. Para a produção de pílulas, comprimidos, comprimidos revestidos e cápsulas de gelatina rígida, é possível usar, por exemplo, lactose, amido de milho ou derivados deste, talco, ácido esteárico ou seus sais etc. Substâncias transportadoras para cápsulas de gelatina macia e supositórios são, por exemplo, gorduras, ceras, polióis semissólidos e líquidos, óleos naturais ou endurecidos etc. Substâncias transportadoras adequadas para a produção de soluções, por exemplo, soluções para injeção, ou de emulsões ou xaropes são, por exemplo, água, solução salina, alcoóis, glicerol, polióis, sacarose, açúcar invertido, glicose, óleos vegetais etc. Substâncias transportadoras adequadas para microcápsulas, implantes ou bastonetes são, por exemplo, copolímeros de ácido glicólico e ácido láctico. As preparações farmacêuticas normalmente contêm cerca de 0,5 a cerca de 90% em peso de um composto da fórmula (I) e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis e/ou seus pró-fármacos. A quantidade do ingrediente ativo da fórmula (I) em qualquer forma estereoquímica, ou em uma mistura de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou em um sal fisiologicamente tolerável ou equivalente químico deste, como descrito acima, nos medicamentos, normalmente é de cerca de 0,5 a cerca de 1.000 mg, de preferência de cerca de 1 a cerca de 500 mg.

Além dos ingredientes ativos da fórmula (I) em qualquer forma estereoquímica, ou uma mistura de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou um sal fisiologicamente tolerável ou equivalente químico deste, como descrito acima, e das substâncias transportadoras, as preparações farmacêuticas podem conter um ou mais aditivos como, por exemplo, agentes de enchimento, desintegrantes, aglutinantes, lubrificantes, agentes umidificantes, estabilizantes, emulsificantes, conservantes, adoçantes, corantes, flavorizantes, aromatizantes, espessantes, diluentes, substâncias de tamponamento, solventes, solubilizantes, agentes para obtenção de um efeito de depósito, sais para alteração da pressão osmótica, agentes de revestimento ou antioxidantes. Elas também podem conter dois ou mais compostos da fórmula (I) em qualquer forma estereoquímica, ou uma mistu-

ra de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou um sal fisiologicamente tolerável ou equivalente químico deste. Caso uma preparação farmacêutica contenha dois ou mais compostos da fórmula (I), a seleção dos compostos individuais poderá ter como objetivo um perfil farmacológico global específico da preparação farmacêutica. Por exemplo, um composto altamente potente com uma duração de ação mais curta pode ser combinado com um composto de longa ação de potência menor. A flexibilidade permitida com relação à escolha de substituintes nos compostos da fórmula (I) permite um grau maior de controle sobre as propriedades biológicas e físico-químicas dos compostos e, dessa forma, permite a seleção desses compostos desejados. Além disso, além de pelo menos um composto da fórmula (I), as preparações farmacêuticas também podem conter um ou mais outros ingredientes terapêutica ou profilaticamente ativos.

Quando se utilizam os compostos das fórmulas (I), a dose pode variar dentro de limites amplos e, como é comum e conhecido pelos médicos, deve ser adaptada às condições individuais de cada caso individual. Ela depende, por exemplo, do composto específico empregado, da natureza e da gravidade da doença a ser tratada, do modo e do esquema de administração, ou se está sendo tratada uma condição aguda ou crônica ou se está sendo feita a profilaxia. Pode ser estabelecida uma dosagem apropriada com a utilização de abordagens clínicas conhecidas na técnica médica. Em geral, a dose diária para a obtenção dos resultados desejados em um adulto pesando cerca de 75 kg é de cerca de 0,01 a cerca de 100 mg/kg, de preferência de cerca de 0,1 a cerca de 50 mg/kg, em particular, de cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg (em cada caso, em mg por kg de peso corporal). A dose diária pode ser dividida, em particular no caso da administração de quantidades relativamente grandes, em várias administrações parciais, por exemplo, 2, 3 ou 4. Como é comum, dependendo do comportamento individual, pode ser necessário se desviar para mais ou para menos da dose diária indicada.

Exemplo 1: Preparação de uma criocultura de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313)

Cem ml de meio de cultura (10 g de amido, 2 g de extrato de levedura, 10 g de glicose, 10 g de glicerina, 2,5 g de pó de milho macerado, 2 g de peptona, 1 g de NaCl, 3 g de CaCO₃ em 1 l de água de torneira, pH 7,2, antes da esterilização) foram semeados com a cepa de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) em um frasco de Erlenmeyer estéril de 500 ml e incubados por 72 horas a 27°C e 120 rpm em um agitador. Subsequentemente, 1 ml da cultura e 1 ml de solução de conservação estéril (20 g glicerina, 10 g de sacarose, 70 ml de água deionizada) foram misturados e armazenados a -80°C. Alternativamente, pequenos pedaços de uma cultura bem desenvolvida em ágar foram transferidos para Cryotubes® (Vangard International) com 1,5 ml de solução estéril de glicerina a 50% e armazenados a -196°C em nitrogênio líquido.

Exemplo 2: Preparação de Labirintopeptinas

Um frasco de Erlenmeyer estéril de 500 ml contendo 100 ml do meio de cultura descrito no Exemplo 1 foi semeado com uma cultura de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) que foi desenvolvida em uma placa de ágar e foi incubada a 27°C e 120 rpm em um agitador. Após 72 horas, mais frascos de Erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura na mesma quantidade foram semeados com 2 ml dessa pré-cultura cada, e incubados sob condições idênticas por 168 horas. Alternativamente, um frasco de Erlenmeyer de 300 ml contendo 100 ml do meio de cultura descrito no Exemplo 1 foi semeado com uma cultura de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) e incubado a 25°C e 180 rpm. Após 72 horas, mais frascos de Erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura na mesma quantidade foram semeados com 5 ml dessa pré-cultura cada, e incubados sob condições idênticas por 168 horas.

Exemplo 3: Isolamento de Labirintopeptinas

Terra diatomácea Hyflo Super-cel a 2% (Hyflo Supercell; VWR, Darmstadt, Alemanha) foi adicionada a 10 l do caldo de cultura de acordo com Exemplo 2, e a cultura foi filtrada através de uma prensa de filtro a fim de separar a solução de cultura dos micélios. O filtrado foi adicionado em uma coluna contendo 1 l da resina Amberlite XAD-16 (diâmetro da coluna:

5,5 cm, altura da coluna: 42 cm), e lavado com 5 l de água deionizada e 5 l de metanol 20% em água. A Labirintopectina foi eluída com 5 l de metanol 60% em água e 5 l de metanol 80% em água. As frações contendo Labirintopectina foram identificadas por HPLC-DAD e LC-ESI-MS, concentradas coletivamente em um evaporador rotatório até que fosse obtido um resíduo aquoso, e subsequentemente liofilizadas. Foram obtidos 300 mg de produto bruto.

Exemplo 4: Cromatografia líquida de alto desempenho com detecção de arranjo de diodo (HPLC-DAD) de Labirintopectinas

10 Coluna: Nucleosil 100 - C₁₈; 20 + 125 mm × 4,6 mm, 5 μ (Machery-Nagel).

Fase móvel: H₃PO₄ a 0,1% em água (Eluente A) e acetonitrila (Eluente B); gradiente linear de 0% a 100% de Eluente B em Eluente A ao longo de um período de 15 minutos.

15 Fluxo: 2 ml por minuto.

Detecção por absorção UV/Vis gerou picos em 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 e 500 nm.

O tempo de retenção da Labirintopectina da fórmula (II): 7,75 minutos.

20 Exemplo 5: Cromatografia líquida de alto desempenho com espectroscopia de massa com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS) de Labirintopectinas

Coluna: Purospher RP-18e; 125 mm (4 mm, 5 μ (Agilent).

25 Fase móvel: ácido trifluoracético a 0,1% em água (Eluente A) e ácido trifluoracético a 0,1% em acetonitrila (Eluente B); gradiente linear de 5% a 100% do Eluente B em Eluente A, ao longo de um período de 10 minutos.

30 Fluxo: 1,5 ml por minuto. O fluxo da interface ES do espectrômetro de massa foi reduzido para 0,4 ml por minuto por meio de um divisor em "T".

Detecção por absorção UV a 210 nm e ESI-MS (modo positivo), em que: uma captura de íons foi usada como analisador de massa.

O tempo de retenção da Labirintopectina da fórmula (III) foi de 5,9 minutos. A massa molecular foi de 1.922 Da.

Exemplo 6: Purificação de Labirintopectinas

O produto bruto de Labirintopectina obtido de acordo com o Exemplo 3 (300 mg) foi dissolvido em uma mistura de sulfóxido de dimetila, metanol e água (1:3:6), e os componentes foram separados por meio de cromatografia em uma coluna Nucleosil 100 - C₁₈ (tamanho de partícula: 10 µ, tamanho da coluna: 250 (16 mm) usando eluição isocrática (água + ácido fórmico 0,1% / metanol 35:65) em uma taxa de fluxo de 20 ml por minuto. As frações foram analisadas com HPLC (conforme o Exemplo 4). Foram obtidos 62 mg de Labirintopectina da fórmula (III) em 99% de pureza.

Exemplo 7: Características gerais de Labirintopectina (III)

O composto da fórmula (III) foi oxidado mediante exposição ao ar nos respectivos sulfóxidos. O composto da fórmula (III) contém 2 cis-amidas entre 2Asp-3Trp e 11Thr-12Gly.

Exemplo 8: ESI-FTICR-espectrometria de massa de alta resolução

Uma solução da Labirintopectina da fórmula (III) em metanol (c = 0,2 mg/ml) foi introduzida através de uma bomba de seringa em uma taxa de fluxo de 2 µl/min a um Bruker Apex III FTICR MS (ímã de 7T) equipado com uma fonte de eletrospray. Os espectros foram registrados no modo positivo com a utilização de uma calibração externa.

m/z observada em Da (z = 2, M + 2 ions de Na ⁺)	984,3333
Exato, massa monoisotópica de neutro [M]	1922,6872
Massa teórica [M] para C ₈₅ H ₁₁₀ N ₂₀ O ₂₄ S ₄	1922,6885
Fórmula molecular	C ₈₅ H ₁₁₀ N ₂₀ O ₂₄ S ₄

Exemplo 9: Análise de Aminoácidos

Hidrólise: Labirintopectina (III) (0,05 mg) foi hidrolisada em atmosfera de nitrogênio com HCl a 6 N, fenol a 5% a 110°C por 24 horas. O hidrolisado foi seco em um jato de nitrogênio.

GC-MS aquiral: o hidrolisado foi aquecido com bis-(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA)/acetonitrila (1:1) a 150°C por 4 h. Para experimentos de GC-MS, foi usado um capilar de sílica fundida a DB5 (l = 15 m × 0,25 µm de sílica fundida revestida com dimetil-(5%-fenilmetil)-polissiloxano,

$d_f = 0,10 \mu\text{m}$; foi usado um programa de temperatura: $T = 65^\circ/3'/6/280^\circ\text{C}$).

GC-MS quiral: o hidrolisado foi esterificado com 200 μl de HCl a 2 N em etanol a 110°C por 30 min e seco. Subsequentemente, a mistura foi acilada com 25 μl de TFAA em 100 μl de diclorometano a 110°C por 10 minutos e seca. Para GC-MS, foi usado um capilar de sílica fundida ($l = 22 \text{ m} \times 0,25 \mu\text{m}$ de sílica fundida revestida com chirasil-S-Val (Machery-Nagel), $d_f = 0,13 \mu\text{m}$; programa de temperatura: $T = 55^\circ/3'/3,2/180^\circ\text{C}$).

		Configuração
Aminoácidos	1 Ala, 1 Thr, 2 Leu, 1 Asp, 2 Cys, 1 Phe, 1 Glu, 2 Trp, 1 Gly	Todos S-aminoácidos

Exemplo 10: Espectroscopia por RMN

Os espectros 2-D por RMN (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC) foram medidos em um espectrômetro de RMN de 600 MHz AMX (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) equipado com uma leitora da sonda de ressonância tripla de 5 mm Z-Grad e em um espectrômetro de RMN DRX500 (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) equipado com uma leitora da sonda inversa de banda ampla de 5 mm Z-Grad. A tabela a seguir mostra os sinais obtidos nas medidas.

Dados da RMN para a Labirintopectina da fórmula (III) em DM-SO-d_6 :

^1H	0,68; 0,71; 0,75; 0,78; 1,05; 1,07; 1,10; 1,35; 1,40; 1,42; 1,49; 1,90; 1,96; 2,00; 2,10; 2,17; 2,26; 2,77; 2,86; 2,90; 2,97; 3,03; 3,14; 3,16; 3,18; 3,18; 3,20; 3,24; 3,29; 3,30; 3,39; 3,59; 3,67; 3,67; 3,72; 3,99; 4,02; 4,03; 4,10; 4,13; 4,14; 4,16; 4,19; 4,34; 4,36; 4,45; 4,49; 4,59; 6,96; 7,26; 7,00; 7,04; 7,08; 7,08; 7,10; 7,18; 7,22; 7,23; 7,24; 7,24; 7,31; 7,35; 7,36; 7,42; 7,51; 7,53; 7,65; 7,65; 7,69; 7,77; 7,84; 7,98; 8,00; 8,01; 8,56; 10,80; 10,81,
^{13}C	19,7; 21,3; 21,4; 22,6; 23,04; 23,2; 23,7; 26,4; 26,4; 27,1; 33,4; 35,2; 35,4; 36,7; 38,3; 40,0; 40,5; 40,7; 40,8; 40,8; 41,2; 41,2; 43,4; 48,4; 48,7; 49,0; 51,2; 51,4; 52,5; 52,6; 52,7; 53,2; 53,5; 54,0; 56,9; 60,0; 60,3; 66,4; 109,8; 110,6; 111,2; 111,2; 117,4; 118,1; 118,1; 118,2; 120,7; 120,7; 122,1; 123,4; 126,5; 127,2; 127,3; 127,8; 129,4; 136,0; 136,1; 136,6; 140,8; 169,4; 173,0; 174,3; 176,9,

Exemplo 11: Cristalografia por raios X de Labirintopectina (III)

Condições de cristalização: a proteína foi dissolvida em Tris a 0,02 M pH 8,2 (concentração de 7 mg/ml). Os cristais cresceram em temperatura ambiente por difusão de gota de vapor de uma mistura 1:1 da solução de proteína com uma solução de etanol a 60%, PEG 6000 a 0,75%, acetato

de sódio a 0,025 M e cloreto de sódio a 0,05 M. Os cristais cresceram em cerca de uma semana.

- Medida: os dados de raios X foram coletados em um difratômetro de 3 círculos Bruker com anodo rotatório e radiação CuK-alfa monocromada em especular. As intensidades foram coletadas em um detector de área SMART 6000 CCD.

Dados dos cristais:

Fórmula	Na N ₂₀ C ₈₅ S ₄ O ₄₈	Na C ₈₅ N ₂₀ O ₂₄ S ₄
Peso da fórmula	2220,29	1834,82
Sistema cristal	ortorrômbico	
Grupo de espaço	<i>P</i> 21 21 2 (nº 18)	
Dimensões da célula unitária	<i>a</i> = 41,1360 Å	
	<i>b</i> = 12,8850 Å	
	<i>c</i> = 25,5900 Å	
Volume da célula	13563,66 Å ³	
<i>Z</i>	4	
Densidade, calculada	1,087 g/cm ³	
Código de Pearson	oP732	
Tipo de fórmula	NO4P20Q48R85	
Sequência de Wyckoff	c ¹⁸¹ b ³ a	

Coordenadas atômicas:

Nº	Átomo	Nº do átomo	x	y	z	Densidade e ⁻
0	Na	NA	0,26282	1,11533	-0,20024	1,0
1	N	18NH	0,16643	0,62593	0,30751	
2	C	18Ca	0,15933	0,69120	0,26221	
3	C	18Cb	0,12264	0,69329	0,24928	
4	S	18Sg	0,11248	0,78619	0,19945	
5	C	18CO	0,16446	0,80225	0,28144	
6	O	18OC1	0,15211	0,83361	0,32212	
7	O	18OC3	0,17868	0,86558	0,25381	0,290
8	O	18OC2	0,18240	0,86116	0,25780	0,710
9	N	17NH2	0,17255	0,50082	0,39461	0,570
10	C	17Ca2	0,19839	0,49670	0,35604	0,570
11	N	17NH1	0,17994	0,49779	0,40196	0,430
12	C	17Ca1	0,20056	0,49833	0,35678	0,430
13	C	17Cb	0,20165	0,38479	0,33630	1,0
14	S	13S1	0,16523	0,32006	0,32001	
15	C	17CO	0,19312	0,57036	0,31036	
16	O	17OC	0,21276	0,57136	0,27366	
17	N	16NH1	0,11776	0,48825	0,45694	0,570
18	C	16Ca1	0,14725	0,54296	0,47554	0,570
19	C	16Cb2	0,14824	0,52387	0,53451	0,570

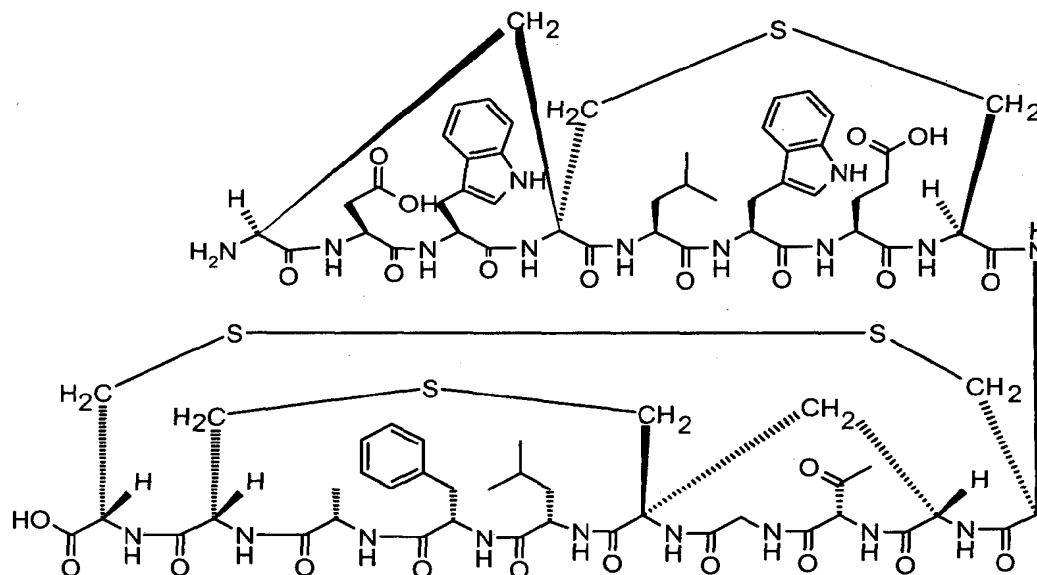
Nº	Átomo	Nº do átomo	x	y	z	Densidade e ⁻
20	C	16CO2	0,17744	0,51223	0,44580	0,570
21	O	16OC2	0,20586	0,50283	0,46026	0,570
22	N	16NH2	0,12522	0,46605	0,47460	0,430
23	C	16Ca2	0,15695	0,50741	0,49039	0,430
24	C	16Cb1	0,17666	0,42678	0,52110	0,430
25	C	16CO1	0,17829	0,54862	0,44623	0,430
26	O	16OC1	0,19399	0,62818	0,45350	0,430
27	N	15NH	0,08606	0,28654	0,38875	1,0
28	C	15Ca	0,08545	0,33846	0,43783	
29	C	15Cb	0,07342	0,26519	0,48191	
30	C	15Cg	0,07342	0,31743	0,53443	
31	C	15Cd1	0,09641	0,30051	0,57015	
32	C	15Ce1	0,09892	0,34692	0,61802	
33	C	15Cz	0,07361	0,41607	0,62963	
34	C	15Ce2	0,04891	0,43679	0,59512	
35	C	15Cd2	0,04787	0,38914	0,54580	
36	C	15CO2	0,11795	0,38518	0,45303	0,570
37	O	15OC2	0,14083	0,32503	0,46100	0,570
38	C	15CO1	0,11985	0,37400	0,45272	0,430
39	O	15OC1	0,14260	0,31215	0,44467	0,430
40	N	14NH	0,09663	0,22957	0,28367	1,0
41	C	14Ca	0,06493	0,21832	0,30973	
42	C	14Cb	0,05881	0,10260	0,32228	
43	C	14Cg	0,06148	0,01917	0,28163	
44	C	14Cd1	0,05246	-0,08320	0,30793	
45	C	14Cd2	0,04038	0,05153	0,23556	
46	C	14CO	0,06073	0,27513	0,35936	
47	O	14OC	0,03420	0,31036	0,37413	
48	N	13NH	0,14348	0,21739	0,21016	
49	C	13Ca	0,13259	0,32131	0,22415	
50	C	13Cb	0,15887	0,37393	0,25639	
51	C	13CO	0,10174	0,31603	0,25729	
52	O	13OC	0,08431	0,39162	0,25920	
53	N	12NH	0,13789	0,04315	0,10383	
54	C	12Ca	0,14494	0,06092	0,15913	
55	C	12CO	0,12665	0,15374	0,17941	
56	O	12OC	0,09846	0,17540	0,16440	
57	N	11NH	0,18026	0,23392	0,10274	
58	C	11Ca	0,18245	0,14769	0,06491	
59	C	11Cb	0,21437	0,08040	0,07601	
60	O	11Og	0,24067	0,15367	0,06932	

Nº	Átomo	Nº do átomo	x	y	z	Densidade e ⁻
61	C	11Cg	0,21483	-0,00652	0,03877	
62	C	11CO	0,15298	0,08188	0,06213	
63	O	11OC	0,14289	0,05192	0,01723	
64	N	10NH	0,15427	0,48630	0,10547	
65	C	10Ca	0,15553	0,39216	0,13693	
66	C	10Cb	0,12680	0,38774	0,17495	
67	C	10CO	0,15563	0,30214	0,09785	
68	O	10OC	0,13341	0,29174	0,06737	
69	N	9NH	0,15921	0,62732	0,02599	
70	C	9Ca	0,17078	0,65813	0,07761	
71	C	9Cb1	0,15364	0,74568	0,10696	0,650
72	S	9Sg2	0,11348	0,70773	0,12986	0,650
73	C	9Cb2	0,14430	0,73147	0,09699	0,350
74	S	9Sg1	0,15631	0,80140	0,15424	0,350
75	C	9CO	0,17309	0,56593	0,11423	1,0
76	O	9OC	0,19300	0,56593	0,15084	
77	N	8NH	0,18541	0,52953	-0,09746	
78	C	8Ca	0,16349	0,52728	-0,05346	
79	C	8Cb	0,15665	0,41428	-0,03791	
80	S	4S1	0,14207	0,33194	-0,08922	
81	C	8CO	0,17870	0,57819	-0,00528	
82	O	8OC	0,20763	0,56423	0,00430	
83	N	7NH	0,20632	0,49826	-0,20125	
84	C	7Ca	0,21045	0,59830	-0,17558	1,0
85	C	7Cb	0,20977	0,68941	-0,21403	
86	C	7Cg	0,23965	0,69290	-0,24846	
87	C	7Cd	0,27179	0,70780	-0,21942	
88	O	7O2	0,27356	0,77789	-0,18617	
89	O	7O2	0,29422	0,64688	-0,23185	
90	C	7CO	0,18551	0,60947	-0,13036	
91	O	7OC	0,16934	0,68669	-0,12474	
92	N	6NH	0,14508	0,31502	-0,23408	
93	C	6Ca	0,17581	0,36438	-0,24779	
94	C	6Cb	0,17865	0,38440	-0,30618	
95	C	6Cg	0,21065	0,42228	-0,32263	
96	C	6Cd1	0,24023	0,37835	-0,31634	
97	N	6Ne	0,26396	0,43927	-0,33810	
98	C	6Ce2	0,24957	0,52674	-0,35877	
99	C	6Cd2	0,21551	0,51704	-0,34959	
100	C	6Ce1	0,19382	0,59341	-0,36554	
101	C	6Cz1	0,20739	0,67707	-0,39101	

Nº	Átomo	Nº do átomo	x	y	z	Densidade e ⁻
102	C	6Ch	0,24169	0,68111	-0,39910	
103	C	6Cz2	0,26459	0,61009	-0,38421	
104	C	6CO	0,17783	0,46644	-0,21817	
105	O	6OC	0,15276	0,51859	-0,21294	
106	N	5NH	0,09092	0,22755	-0,18031	
107	C	5Ca	0,10636	0,17447	-0,22462	
108	C	5Cb	0,08579	0,17788	-0,27331	
109	C	5Cg1	0,06556	0,08855	-0,29223	0,400
110	C	5Cd2	0,05562	0,00295	-0,25553	0,400
111	C	5CD3	0,03406	0,13232	-0,31950	0,400
112	C	5Cg2	0,05122	0,12511	-0,26843	0,600
113	C	5Cd1	0,05227	0,02119	-0,24021	0,600
114	C	5Cd2	0,03647	0,22422	-0,25795	0,600
115	C	5CO	0,14049	0,21405	-0,23552	1,0
116	O	5OC	0,16220	0,15250	-0,24447	
117	N	4NH	0,04424	0,29531	-0,10297	
118	C	4Ca	0,07828	0,26318	-0,08968	
119	C	4Cb	0,09901	0,36213	-0,08847	
120	C	4CO	0,09150	0,19084	-0,13193	
121	O	4OC	0,10378	0,10656	-0,12020	
122	N	3NH	-0,02049	0,37136	-0,10602	
123	C	3Ca	-0,01386	0,26387	-0,12087	
124	C	3Cb	-0,02263	0,24478	-0,17726	
125	C	3Cg	-0,05642	0,26752	-0,19336	
126	C	3Cd1	-0,08244	0,28646	-0,16303	
127	N	3Ne	-0,10966	0,30431	-0,19328	
128	C	3Ce2	-0,10052	0,29888	-0,24451	
129	C	3Cd2	-0,06697	0,27528	-0,24627	
130	C	3Ce1	-0,05275	0,26512	-0,29539	
131	C	3Cz1	-0,07001	0,27753	-0,33970	
132	C	3Ch	-0,10351	0,30097	-0,33634	
133	C	3Cz2	-0,11905	0,31339	-0,29019	
134	C	3CO	0,02125	0,22763	-0,11313	
135	O	3OC	0,02703	0,13349	-0,11547	
136	N	2NH	0,00873	0,33093	-0,00078	
137	C	2Ca	-0,02584	0,34024	-0,01079	
138	C	2Cb	-0,04293	0,38712	0,03587	
139	C	2Cg	-0,07852	0,41234	0,02763	
140	O	2Od1	-0,09430	0,35452	-0,00285	
141	O	2Od2	-0,09060	0,48825	0,05303	
142	C	2CO	-0,02912	0,40784	-0,06006	

Nº	Átomo	Nº do átomo	x	y	z	Densidade e ⁻
143	O	2OC	-0,03851	0,49903	-0,05444	
144	N	1NH	0,07381	0,20163	0,05701	
145	C	1Ca	0,06250	0,25417	0,00903	
146	C	1Cb	0,07969	0,20450	-0,03763	
147	C	1CO	0,02526	0,24331	0,00649	
148	O	1OC	0,01235	0,15545	0,00653	

Exemplo 12: Oxidação de Labirintopectina (III)



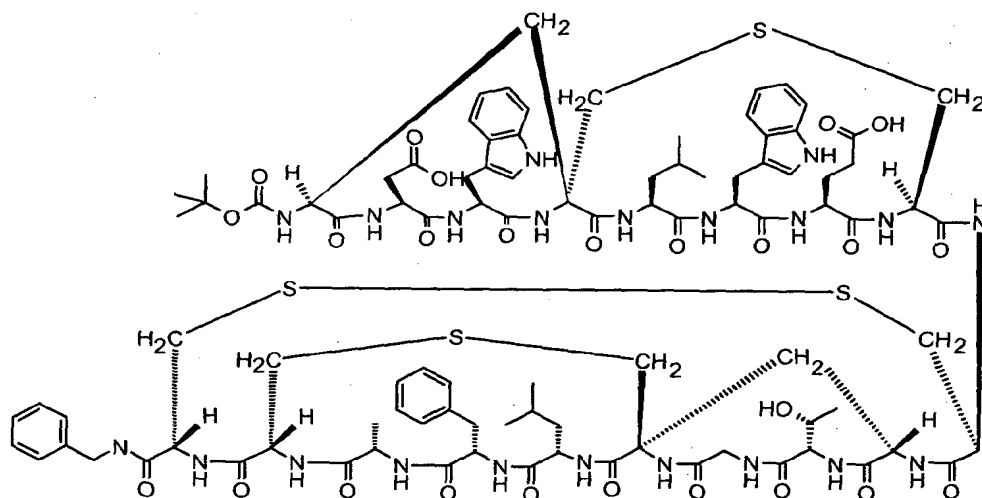
Cinquenta mg de Labirintopectina (III) (0,026 mmol) foram dissolvidos em 1 ml de DMSO e misturados com 11 mg de 1-hidróxi-1-óxido-1,2-benziodoxol-3(1H)-ona (IBX, 0,039 mmol) em temperatura ambiente. A mistura foi agitada por 6 h a 40 °C e por mais 12 h em temperatura ambiente, e subsequentemente purificada por HPLC de fase reversa em uma coluna Phenomenex Luna[®] Axia C18 de 5 µm (2) (dimensão: 100 mm x 30 mm) com uma pré-coluna XTerra[®] Prep MS C18 de 10 µm (Waters, Dimensão: 19 x 10 mm). Um gradiente de 5% a 95% de acetonitrila em água ao longo de 30 min (contendo acetato de amônio 0,1%, pH 7,0) foi usado como o eluente. O fluxo da coluna (60 ml/min) foi fracionado e, por detecção UV, a Fração 7 a 11 continha o composto desejado. As referidas frações geraram 25 mg (50%) após liofilização. O produto foi caracterizado por espectroscopia de massa (Bruker Daltonics MicroTof).

ESI-MS: Peso molecular (PM) = 1920,66518 (PM mono)

Fórmula molecular: C₈₅H₁₀₈N₂₀O₂₄S₄

Peso molecular (PM) = 1922,2

Exemplo 13: Síntese peptídica na extremidade do terminal C de Labirinto-
peptinas (III)



Quarenta mg de Labirinto-peptina (III) (0,021 mmol) foram dissolvidos em 2 ml de dimetilformamida abs., e tratados com 10 mg (0,045 mmol) de di-*terc*-butil-dicarbonato (Boc₂O) e 7 mg (0,054 mmol) de diisopropiletilamina por 1 h em temperatura ambiente. Subsequentemente, 6,8 mg (0,063 mmol) de benzilamina e 50 µl (0,072 mmol) de uma solução 50% de anidrido de ácido propil fosfônico em DMF foram adicionados. A mistura de reação foi purificada por meio de HPLC de fase reversa em uma coluna C18 Waters XBridge Shield[®] de 5 µm (dimensão: 100 mm x 30 mm) contendo uma pré-coluna C18 XBridge Shield[®] de 10 µm (Waters, dimensão: 19 x 10 mm). Um gradiente de 5% a 95% de acetonitrila em água ao longo de 30 min (contendo acetato de amônio 0,1%, pH 7,0) foi usado como o eluente. O fluxo da coluna (60 ml/min) foi fracionado e por detecção UV. As frações 30 e 31 foram combinadas e geraram 9,6 mg (22 %) do composto desejado. O produto foi caracterizado por espectroscopia de massa (Bruker Daltonics MicroTof).

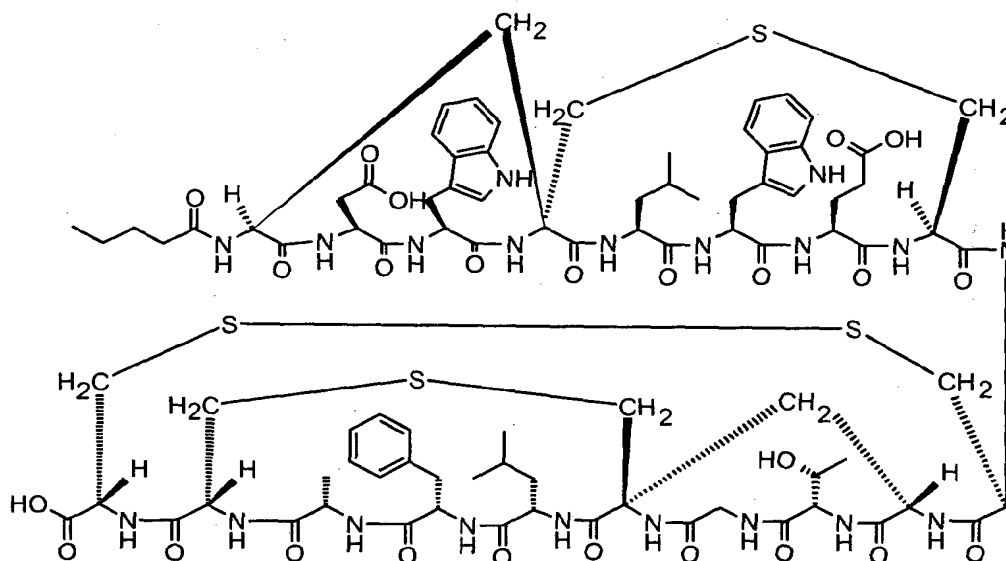
UV: 222 sh, 276 nm

ESI-MS: PM = 2111,79018 (PM mono)

Fórmula molecular: C₉₇H₁₂₅N₂₁O₂₅S₄

Peso molecular (PM) = 2113,5

Exemplo 14: Síntese peptídica na extremidade do terminal N de Labirinto-peptinas (III)



5

Cinco mg (0,028 mmol) de 2-cloro-4,6-dimetóxi-1,3,5-triazina (CDMT) foram dissolvidos em 2 ml de dimetilformamida abs., e misturados com 8,6 mg (0,085 mmol) de N-metilmorfolina (NMM). A mistura foi agitada por 1 h em temperatura ambiente. Foram adicionados 3,3 mg (0,028 mmol) de ácido n-caprônico, e a mistura foi agitada por mais 30 min em temperatura ambiente. Subsequentemente, 40 mg (0,021 mmol) de Labirinto-peptina (III) foram adicionados, e a mistura resultante foi agitada por mais 2 h em temperatura ambiente. A mistura de reação foi purificada por meio de HPLC de fase reversa em uma coluna C18 Waters XBridge Shield® de 5 µm (dimensão: 100 mm x 30 mm) com uma pré-coluna C18 XBridge Shield® de 10 µm (Waters, dimensão: 19 x 10 mm). Um gradiente de 5% a 95% de acetoni-trila em água ao longo de 30 min (contendo ácido fórmico 0,1%, pH 2,0) foi usado como o eluente. O fluxo da coluna (60 ml/min) foi fracionado e por detecção UV. As frações 38 a 40 foram combinadas e geraram 11,0 mg (26 %) do composto desejado. O produto foi caracterizado por espectroscopia de massa (Bruker Daltonics MicroTof).

15

20

UV: 220 sh, 278 nm

ESI-MS: PM = 2020,75738 (PM mono)

Fórmula molecular: C₉₁H₁₂₀N₂₀O₂₅S₄

Peso molecular (PM) = 2022,3

Exemplo 15: Atividade antibacteriana

- 5 Após cultivo dos organismos em caldo de extrato de carne líquido, as suspensões de bactérias foram ajustadas até uma densidade definida por diluição com meio de cultura fresco ($5 \cdot 10^5$ organismos/ml).

- Labirintopectina (III) foi dissolvida e diluída com água em uma série de diluição geométrica (fator 2). Foi misturado 1,5 ml da solução nas etapas de diluição individuais com 13,5 ml de ágar líquido (ágar de Muller-Hinton) a aproximadamente 45°C.

A concentração máxima de composto na placa de petri foi normalmente de 100 mg/l. Uma placa de ágar sem composto serviu como um controle.

- 15 Após o meio de cultura ter sido resfriado e solidificado, as placas de ágar foram inoculadas simultaneamente com 20 cepas bacterianas diferentes usando um inoculador Multipoint que libera $5 \cdot 10^4$ unidades de formação de colônias (cfu) por "spot" de inoculação, e depois incubadas a 37°C por 17 horas sob condições aeróbicas.

- 20 Após incubação, as placas foram examinadas macroscopicamente quanto à menor concentração de composto na qual o crescimento bacteriano não era mais visível. Uma colônia única ou um crescimento turvo no "spot" de inoculação era descartado.

- 25 O efeito antibacteriano foi avaliado como a Concentração Inibidora Mínima do composto de teste (MIC: menor concentração de composto na qual o crescimento bacteriano não é mais visível macroscopicamente):

Organismo de Teste	MIC
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	12,5 mg/l
<i>Staphylococcus aureus</i> 285	12,5 mg/l
<i>Staphylococcus aureus</i> 503	3,13 mg/l
<i>Streptococcus pyogenes</i> 308 A	3,13 mg/l
<i>Streptococcus pyogenes</i> 77 A	3,13 mg/l
<i>Streptococcus faecium</i> D	6,25 mg/l

Exemplo 16: Atividade Antiviral

Os vírus só podem se multiplicar em células vivas. Portanto, foram realizados estudos virais em culturas de células. Os vírus foram selecionados por causa de sua importância como agentes infecciosos ou por estruturas bioquímicas ou morfológicas típicas.

- 5 Uma série de diluição de Labirintopectina (III) foi preparada em placas de microtitulação de 96 cavidades. São adicionadas células Hela ou Vero, de acordo com o vírus infectante, para gerar uma monocamada confluyente em até 24 horas de incubação. Após incubação por 3 horas, o respectivo vírus é adicionado às células em uma concentração que supostamente destrói completamente a monocamada de células em até 2 dias. As culturas são incubadas a 37°C em uma incubadora desgaseificada (CO₂ a 5% no ar). Após 24 horas, a dose máxima tolerada de composto de teste (MTD) na cultura de células é avaliada por exame microscópico. Os resultados foram comparados com controle de tecido não-infectado e com um controle de infecção correspondente:

Nº	Organismo Hospedeiro	Organismo de Teste	Inibição [mg/l]
1	Células Vero	Micovírus (RNA/Influenza A/Aichi)	44,44
2	Células Hela	Herpes (DNA), Simples 1	133,33
3	Células Vero	Herpes (DNA), Simples 2 VR 734	44,44
4	Células Hela	Adenovírus (DNA), 5"	133,33

Exemplo 17: Atividade na Dor Neuropática

- A Labirintopectina (III) foi estudada no modelo em camundongo de lesão nervosa limitada (SNI) de dor neuropática a fim de provar a atividade sobre alodinia tátil. Sob anestesia geral, as duas ramificações principais do nervo ciático em machos adultos de camundongos C57B6 (22,7 g $\pm$ 0,26 SEM) foram ligadas e seccionadas, com o nervo sural deixado intacto. A alodinia tátil foi determinada com o teste automático de von Frey: usando uma picada abrupta com agulha, a pele plantar das patas traseiras foi exposta a um estímulo de pressão de intensidade crescente até 5 g. A força em grammas na qual o animal respondia com retirada da pata traseira foi usada como uma leitura para alodinia tátil. O estudo foi realizado 7 dias após a lesão nervosa ao longo de 6 horas, com uma medida adicional após 24 horas. Em até dois dias após a secção do nervo, a alodinia tátil se desenvolveu comple-

tamente e permaneceu estável ao longo de pelo menos duas semanas. O composto foi administrado por via intravenosa como uma aplicação única (3 mg/kg). Como veículo para aplicação intravenosa, foi usada uma solução 1:1:18 de etanol : solutol : solução salina tamponada com fosfato.

5 As medidas do limiar de retirada da pata (PWT) foram usadas para calcular os efeitos significativos do tratamento, e para os cálculos da AUC ao longo de um período de tempo de referência (6 horas) e subsequentes cálculos do % de benefício. Para análise estatística, os valores de PWT das patas traseiras ipsilaterais foram usados de duas formas: primeiro, com
10 um ANOVA de duas vias baseado nos valores de PWT por tempos específicos (dentro de um período de 24 horas) e segundo com um ANOVA de uma via em valores de AUC delta não-transformados de |AUC1-6 horas|.

 A análise da variância em duas vias com medidas repetidas (Fator repetido: TIME, Variável da análise: PWT), seguida por uma Análise
15 Complementar (Efeito do fator GRUPO para cada nível do fator TEMPO (análise de Winer), Variável da análise: PWT) e um teste de Dunnett subsequente para o fator TRATAMENTO para cada nível do fator TEMPO (comparação de duas vias vs nível VEÍCULO), revelaram diferenças altamente significantes do grupo de veículo de 1 a 6 horas após a aplicação intravenosa
20 para cada composto. O efeito desaparecia 24 horas após a aplicação. ANOVA de uma via usando os valores delta |AUC1-6 horas| revelou um valor p de $p < 0,0001$. A análise de Dunnett gerou efeitos significantes do tratamento para ambos os compostos. O benefício percentual do tratamento foi avaliado com o uso dos valores de |AUC1-6 horas| do grupo de veículo ipsilateral (0% de benefício) e todos os valores de |AUC1-6 horas| dos lados contralaterais
25 de todos os três grupos (100% de benefício = efeito máximo possível). Comparada com essas margens, Labirintopectina (III) alcançou 97% de benefício.

 Em conclusão, o composto reduz significativamente a alodinia
30 tátil no modelo de SNI em camundongo de dor neuropática.

Exemplo 18: Atividade na Dor de Origem Inflamatória

 A Labirintopectina (III) foi estudada no modelo de inflamação na

pata traseira induzida por carragenina (CAR) em camundongos a fim de provar a atividade sobre hiperalgesia térmica, uma leitura típica para dor de origem inflamatória.

Indução de inflamação da pata traseira: sob ligeira anestesia geral com Isoflurano, CAR a 2% (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) em 20 µl de solução salina foi injetada na face plantar de ambas as patas traseiras em machos de camundongos C57B6. As latências de retirada da pata (PWL) foram determinadas mediante exposição das patas a um estímulo térmico definido usando um aparelho disponível comercialmente (Plantar Test Ugo Basile Biological Research Apparatus, Comerio, Itália), adaptado com uma minicâmera para assegurar a colocação adequada do calor infravermelho abaixo da pata traseira de interesse. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de teste durante todo o período de estudo (6 horas).

Medida de hiperalgesia térmica: o cronômetro que mede a duração da luz infravermelha que reflete na pata traseira é iniciado pelo pesquisador e interrompido, caso o animal agite a pata traseira afetada. Um valor de corte foi definido em 16 segundos para evitar dano tecidual. O estudo foi realizado antes e ao longo de 6 horas após a injeção de CAR. As latências de retirada da pata em segundos foram usadas como leitura para análise posterior.

Como veículo para a aplicação intravenosa, foi usada uma solução 1:1:18 de etanol : solutol : solução salina tamponada com fosfato).

As medidas das latências de retirada da pata (PWL) foram usadas para calcular os efeitos significantes do tratamento, e para os cálculos da AUC ao longo de um período de tempo de referência (6 horas) e subsequentes cálculos do % de benefício. Para análise estatística, os valores de PWT de ambas as patas traseiras foram usados de duas formas: primeiro, com uma análise de variância de duas vias (ANOVA) baseada nos valores de PWT por tempos específicos (dentro de um período de 6 horas), e segundo com um ANOVA de uma via em valores de AUC delta não-transformados de |AUC1-6 horas|.

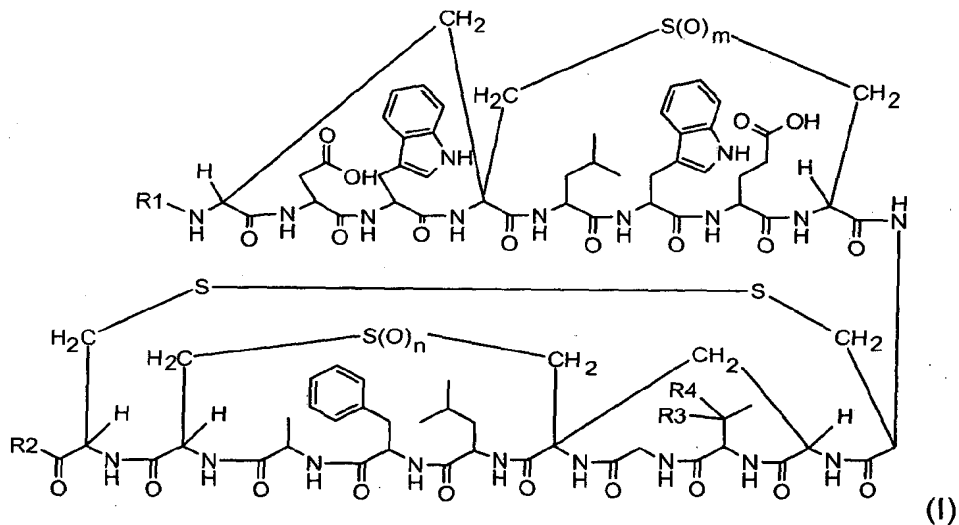
A análise de variância de duas vias com medidas repetidas (Fa-

tor repetido: TEMPO, Variável da análise: PWL), seguida por uma Análise Complementar (Efeito do fator GRUPO para cada nível do fator TEMPO (análise de Winer), Variável da análise: PWL) e um teste de Dunnett subsequente para o fator DOSAGEM para cada nível do fator TEMPO (comparação de duas vias vs nível 0 = VEÍCULO) revelaram diferenças altamente significantes do grupo de veículo de 1 a 2 horas após a aplicação intravenosa para ambas as dosagens. O efeito desaparecia 4 horas após a aplicação. ANOVA de uma via usando os valores delta |AUC1-6 horas| revelou um valor p de $p < 0,0001$. A análise de Dunnett geriu efeitos significantes do tratamento para ambas as dosagens. O benefício percentual do tratamento foi avaliado com o uso dos valores de |AUC1-6 horas| do grupo de veículo (0% de benefício) e todos os valores de |AUC1-6 horas| antes de a CAR ter sido injetada (valor de base teórico ao longo de 6 horas = efeito máximo possível = 100% de efeito). Comparado com essas margens, o grupo de dosagem de 1 mg/kg alcançou 37% e o grupo 10 mg/kg alcançou 34% de benefício.

Em conclusão, o composto reduziu significativamente a hiperalgesia térmica no modelo CAR em camundongo de dor de origem inflamatória.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto da fórmula (I)



em que:

R1 é H, C(O)-(C₁-C₆)alquila ou C(O)-O-(C₁-C₆)alquila;

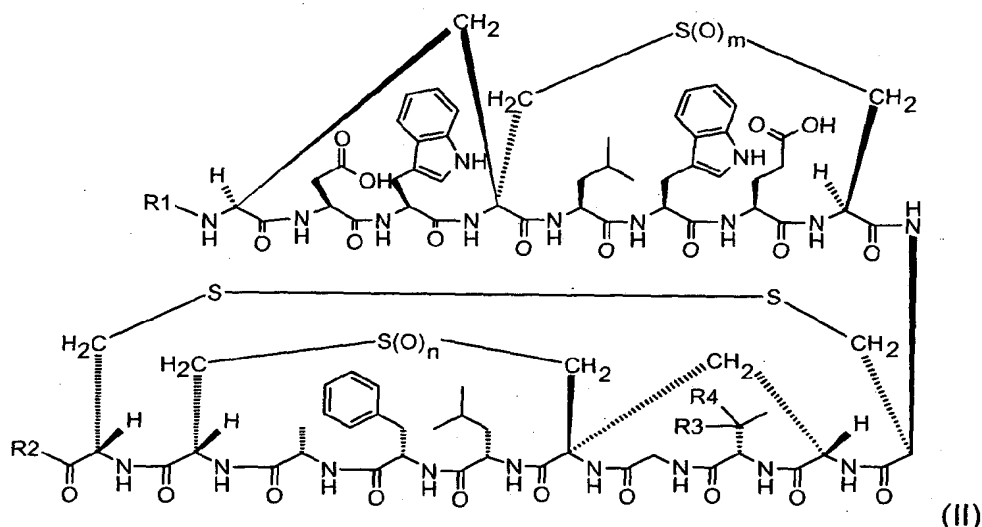
5 R2 é OH, NH₂, NH-(C₁-C₆)alquila, NH-(C₁-C₄)alquileno-fenila ou NH-(C₁-C₄)alquileno-piridil;

R3 e R4, independentemente um do outro, são H ou OH, ou R3 e R4 juntos são =O; e

m e n são, independentemente um do outro, 0, 1 ou 2;

10 em qualquer forma estereoquímica, ou uma mistura de quaisquer formas estereoquímicas em qualquer proporção, ou um sal fisiologicamente tolerável destas.

2. Composto da fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela fórmula (II)



3. Composto da fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que R1 é H.

4. Composto da fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1 ou 3, em que R2 é OH.

5. Composto da fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1 ou 4, em que R3 e R4 são H ou OH em que, se R3 for OH, então R4 será H, ou se R3 for H, então R4 será OH, ou R3 e R4 juntos são =O.

6. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que R3 é OH e R4 é H ou, se R3 for H, R4 será OH.

7. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que m e n são 0, ou m e n são 2, ou m é 0 e n é 2, ou m é 2 e n é 0.

8. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que m e n são 0.

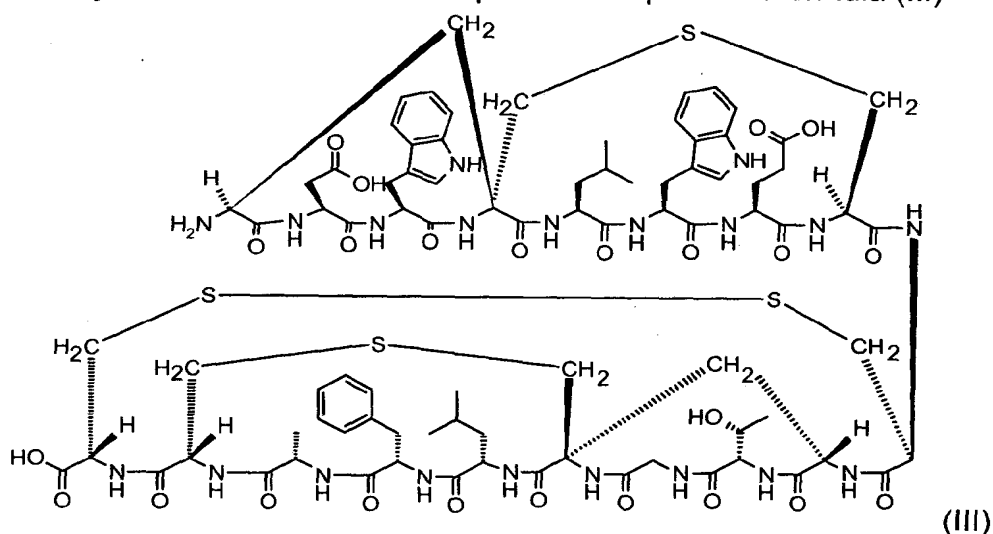
9. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que R1 é H; R2 é OH; R3 e R4, independentemente um do outro, são H ou OH, em que, se R3 for OH, então R4 será H, e se R3 for H, então R4 será OH; e m e n são, independentemente um do outro, 0, 1 ou 2.

10. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que R1 é H; R2 é OH; R3 e R4, independentemente um do outro, são H ou OH em que, se R3 for OH, então R4 será H, e se R3

for H, então R4 será OH; e m e n são 0, ou m e n são 2, ou m é 0 e n é 2, ou m é 2 e n é 0.

11. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que R1 é H; R2 é OH; R3 e R4, independentemente um do outro, são H ou OH em que, se R3 for OH, então R4 será H, e se R3 for H, então R4 será OH; e m e n serão 0.

12. Composto da fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por um composto da fórmula (III)



13. Composto isolado de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), caracterizado por uma massa molecular monoisotópica neutra de 1922,6872 Da, e uma fórmula molecular de C₈₅H₁₁₀N₂₀O₂₄S₄.

14. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, para a preparação de um medicamento para o tratamento de infecções bacterianas, infecções virais e/ou dor.

15. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos um composto da fórmula (I) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, e pelo menos um ingrediente farmacêuticamente aceitável.

16. Processo para a preparação de um composto da fórmula (I) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, que compreende:
- a) a cepa de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), ou uma de suas variantes e/ou mutantes, sendo fermentadas sob condições adequadas em um meio de cultura, até que um ou mais dos compostos da fórmula (I) se

acumule no meio de cultura,

b) um composto da fórmula (I) sendo isolado do meio de cultura,

e

5 c) o composto da fórmula (I) sendo derivatizado, quando apropriado, e/ou, quando apropriado, sendo convertido em um sal fisiologicamente tolerado.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, em que o composto (I) é caracterizado por um composto da fórmula (II).

10 18. Processo de acordo com a reivindicação 16 ou 17, em que o composto (I) é caracterizado por um composto da fórmula (III).

19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, em que m e n são 0, ou m e n são 2, ou m é 0 e n é 2, ou m é 2 e n é 0.

RESUMO

Patente de Invenção: **"PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E ANTIVIRAIS DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS"**.

5 A presente invenção refere-se a um composto da fórmula (I), em que R3 e R4 são, independentemente um do outro H ou OH, e em que m e n são, independentemente um do outro, 0, 1 ou 2, que pode ser obtido a partir de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), seu uso para o tratamento de infecções bacterianas, infecções virais e/ou dor, e uma composição farmacêutica que o contém. Os compostos de fórmula (I) foram definidos como

10 labirinto peptinas e consistem em uma estrutura peptídica altamente ligada em ponte de 18 aminoácidos contendo resíduos semelhantes à lantionina e análogos alfa dissustituídos de aminoácidos. A sequência de aminoácidos é XDWXLWEXCXTGXLFXC, em que os dois resíduos de Cys formam uma ponte de dissulfeto e cada X, independentemente, representa um dos ami-

15 noácidos não-naturais envolvidos nas ligações em ponte.