

(11) *Número de Publicação:* **PT 94555 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07K007/06 A

C12P021/04 B

A61K038/00 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) <i>Data de depósito:</i> 1990.06.29	(73) <i>Titular(es):</i> MERCK & CO., INC. RAHWAY NEW JERSEY 07065-0906 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1989.06.30 US 374416 1990.03.12 US 492024 1990.03.12 US 492025	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1991.05.22	(72) <i>Inventor(es):</i> ROBERT E. SCHWARTZ US OTTO D. HENSENS US JERROLD M. LIESCH US RAYMOND F. WHITE US HENRI JOSHUA US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 11/96 1996.11.25	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM DERIVADO DE EQUINOCANDINA B, ÚTIL COMO ANTIBIÓTICO

(57) *Resumo:*

PRODUÇÃO DE UM DERIVADO DE EQUINOCANDINA B; AGENTE ANTIBIÓTICO; LIPOPEPTÍDEO CÍCLICO

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 94.555

REQUERENTE: MERCK & CO.. INC.. norte-americana. industrial. com sede em Rahway. New Jersey
07065-0906. Estados Unidos da América do Norte

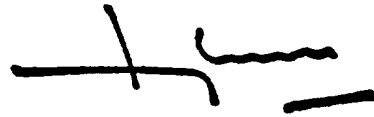
EPÍGRAFE: "METODO PARA A PRODUÇÃO DE UM DERIVADO DE
EQUINOCANDINA B. UTIL COMO ANTIBIOTICO"

INVENTORES: Robert E. Schwartz. Raymond F. White. Jerrold
M. Liesch. Otto D. Hensens. Henry Joshua.
Dennis M. Schmatz. Jan S. Tkacz. Louis Kaplan
Margaret S. Sosa. Jimmy M. Fountoulakis.
Robert A. Giacobbe e Prakash S. Masurekar

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

Estados Unidos. 30 de Junho 1989. No. 374.416 e 12 de Março 1990. Nos. 492.025. 492.026 e 492.024

94.333



MERCK & CO., INC.

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM DERIVADO DE EQUINOCANDINA B, ÚTIL
COMO ANTIBIÓTICO"

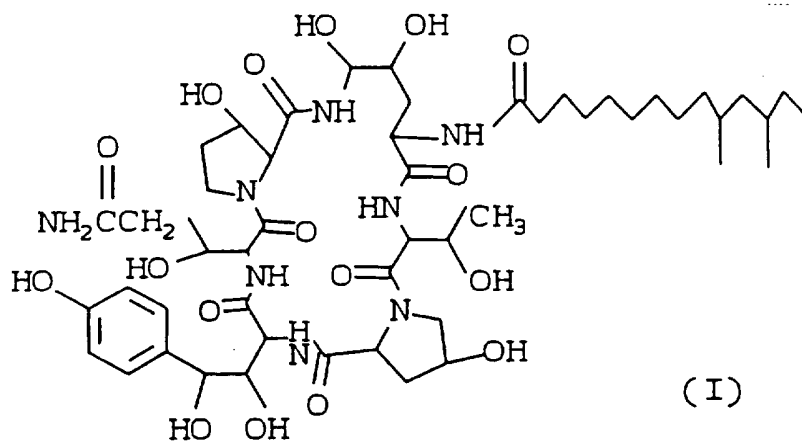
=====

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um método para a produção de um agente antibiótico, através da cultura de Zalerion arboricola.

Este antibiótico é um lipopeptídeo cíclico que tem a fórmula (I):

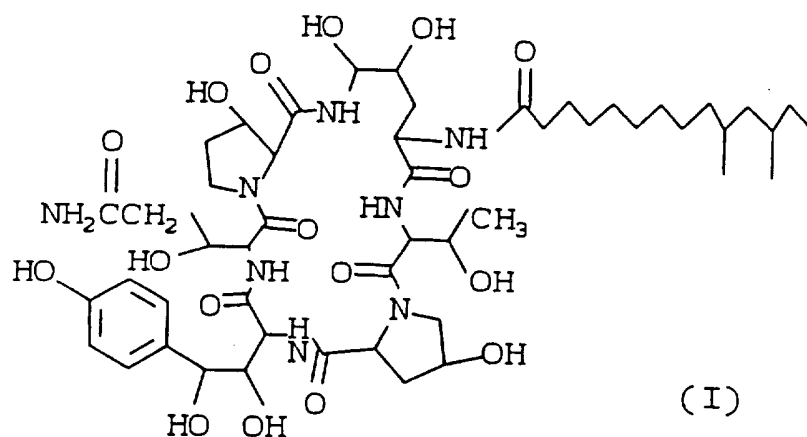


e apresenta uma intensa actividade contra os agentes patogénicos humanos e com uma muito baixa toxicidade em relação a mamíferos.

O presente invento diz respeito a um composto produzido por fermentação ou cultura do microorganismo Zalerion arboricola e a métodos para uma produção aumentada do composto e sua utilização como um agente anti-fúngico e como um agente anti-pneumocystis.

DESCRIÇÃO DO INVENTO

O presente requerimento é dirigido a uma substância previamente não reconhecida que se verificou ser útil como um agente anti-fúngico e como um agente anti-pneumocystis e que é produzida através de cultura de Zalerion arboricola em condições aeróbicas. O requerimento é também dirigido a processos aperfeiçoados para a obtenção do composto e a um processo para a obtenção do composto como o produto principal. O novo produto pode ser representado pela fórmula



O composto pode ser denominado:

1-[4,5-dihidroxi-N²-(10,12-dimetil-1-oxotetradecil)ornitina]-5-(3-hidroxi glutamina)-6-(3-hidroxi prolina)equinocandina B.

Pensa-se que o estereoisómero preferido seja:

1-[4,5-dihidroxi-N²-(10,12-dimetil-1-oxo-tetradecil)-L-ornitina]-5-(3-hidroxi-L-glutamina)-6-[3-hidroxi-L-prolinaequinocandina B.

O presente invento também inclui métodos aperfeiçoados para a produção de composições enriquecidas no composto com a fórmula (I), para melhorar a taxa de produção do composto e ainda para produzir o composto como o produto principal.

A estrutura do composto foi determinada pela análise detalhada das características espectrais.

DADOS DO ESPECTRO DE MASSA

Os dados do espectro de massa por impacto de electrões (EI) foram obtidos num espectrómetro de massa Finnigan-MAT 212 a 90 eV. A análise por Cromatografia Gasosa-Espectrograma de Massa (GC-MS) dos derivados do TMS (trimetilsililo) dos hidrolisados ácidos totais foi realizada no mesmo instrumento. Os espectros de massa por bombardeamento atómico rápido (FAB) foram registados num instrumento VG20-253.

O composto IA tem o peso molecular 1064 por FAB-MS (observou (M+Li)⁺ a m/z 1071). GC-MS do hidrolisado ácido total apresentou um equivalente de cada um de entre treonina, 4-hidroxi prolina, ácido 3-hidroxi glutâmico, 3-hidroxi prolina, e um ácido gordo C₁₆ saturado.

DADOS DO ESPECTRO DE RMN

Composto I

Espectro ^1H RMN: em CD_3OD a 400 MHz é tal como indicado na Figura 1; e

Desvios Químicos de ^{13}C RMN obtida em CD_3OD a 75 MHz em ppm em relação a TMS a ppm zero usando um pico de solvente a 49,0 ppm como padrão interno: 11,6, 19,7, 20,2, 20,7, 27,0, 28,1, 30,30, 30,34, 30,6, 30,8, 31,18, 31,24, 32,9, 34,5, 34,8, 36,7, 38,1, 38,5, 39,4, 45,9, 47,0, 51,4, 55,6, 56,3, 57,1, 58,3, 62,5, 68,2, 69,8, 70,55, 70,68, 71,3, 73,9, 74,3, 75,8, 76,9, 116,2(2X), 129,6(2X), 133,0, 158,5, 169,1, 172,5, 172,7, 172,9, 173,4, 174,5, 175,8, 177,2 ppm.

Baseados nestes e noutros dados, pensa-se que o Composto I possui, com considerável certeza, a estrutura indicada.

O composto é um sólido branco solúvel em solventes orgânicos tais como metanol, etanol, dimetilformamida, dimetil sulfóxido, acetato de etilo, etc.

O composto deste invento possui propriedades ant-fúngicas contra tanto fungos filamentosos como leveduras. é particularmente útil contra organismos que causam infecções micóticas patogénicas tais como Candida albicans, Candida rugosa, Candida parapsilosis etc, em relação aos quais não apenas é apresentada elevada actividade mas também actividade consistentemente elevada em relação a um extenso painel de estirpes de organismos.

Além disso, diferentemente de um certo número de agentes anti-fungicos, tais como a anfotericina B, os quais

embora activos contra Candida albicans e certos outros fungos patogénicos, são limitados na sua utilidade devido a efeitos secundários inconvenientes e perigosos, os agentes do presente invento são não apenas agentes anti-fungicos muito eficazes mas são também substancialmente não tóxicos e substancialmente livres de reacções secundárias indesejáveis.

A lise dos glóbulos vermelhos sanguíneos, uma reacção secundária potencialmente fatal acompanha muitos compostos em concentrações próximas da dose terapêutica e esta propriedade tem limitado a aplicação destes compostos como medicamentos. Pensa-se que o composto com a fórmula (I) requiere uma concentração muito superior à da utilização terapêutica antes de ocorrer a lise dos glóbulos vermelhos sanguíneos.

O composto é também anti-fúngicamente eficaz contra fungos filamentosos incluindo a espécie Aspergillus, a espécie Penicillium, a espécie Fusarium, a espécie Alternaria, a espécie Neurospora, etc.

Além disso, o composto é também útil como um agente para o tratamento de Pneumocystis carinii, o agente causador de uma pneumonia de particular gravidade para os doentes com deficiência imunitária tais como os que adquiriram o síndrome de imuno deficiência, (SIDA).

O composto do presente invento é convenientemente produzido fazendo crescer uma cultura de Zalerion arboricola, identificada como MF 5171 na colecção de culturas da Merck, que se encontra depositada de acordo com o Tratado de Budapeste na Colecção de Culturas da American Type Culture Collection em 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 e que tem o número de acesso ATCC 20868.

Embora a produção dos novos compostos seja discutida aqui a seguir principalmente no que se refere a uma estirpe específica, ATCC 20868, todas as estirpes do género Zalerion arboricola e mutantes são contemplados no âmbito deste invento.

Contudo, um mutante particular identificado na Colecção de Culturas Merck como MF-5404 e acessível a partir da American Type Culture Collection como Z. arboricola ATCC 20957 é particularmente útil na produção de Composto I. A utilização deste mutante na produção do Composto I é também descrita aqui a seguir.

A descrição das colónias e da morfologia de ATCC 20868 e de ATCC 20957 é indicada a seguir:

Colónias em agar de batata-dextrose (Difco) a 20°C crescendo lentamente, atingindo um diâmetro de 8-12 mm numa semana. Colónias maduras (3-4 semanas) em esfregaço de agar de batata-dextrose, com hifas submersas e aéreas, superfície peluda, lanosa, ou funiculose, baça a moderadamente brilhante, formando colónias elevadas, densamente compactas, com uma textura substrófica devida a densa formação de conídias. Cor das colónias castanho-azeitona claro, azeitona, castanho azeitona e finalmente preto azeitona, Isabella Color, Sayal Brown, Tawny-olive, Saccardo's Umber, Sepia, Brownish Olive, Raw Umber, Dark Olive, Olivaceous Black (nomes de cores obtidos a partir de R. Ridgway. 1912. Color Standards and Nomenclature, Washington, D.C.). As mesmas cores no reverso das colónias. Odores, exsudados e pigmentos solúveis ausentes.

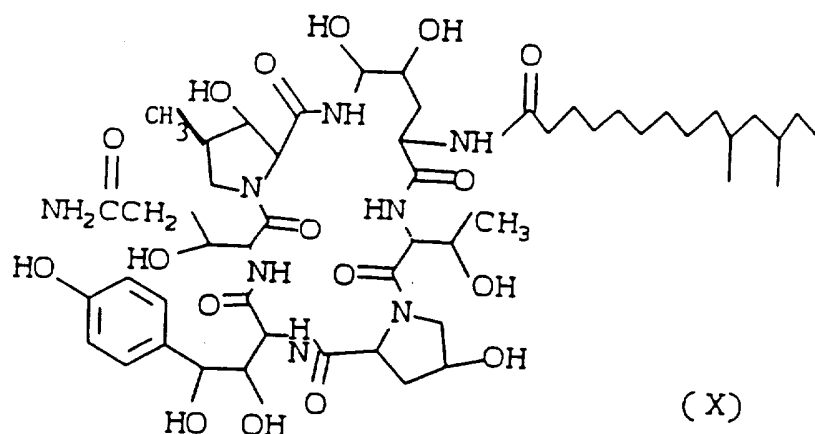
Hifas (em 3% KOH) castanho amarelado claro a castanho azeitona, septadas, ramificadas, frequentemente com lobos laterais ou terminais, com 1-3 µm de largura, com paredes delgadas a

ligeiramente delgadas, com paredes macias a ligeiramente incrustadas ou verrugosas. As hifas aéreas aderem frequentemente entre si formando fascículos. Cerdas e hifopodias ausentes.

Células conidiogénicas monoblásticas, espalhadas a densas, integradas, terminais e intercalares, originando-se directamente de hifas não diferenciadas, em angulos rectos a ligeiramente agudos. As conídias que se originam como cadeias, filamentos ou cordas irregulares, desenvolvem-se posteriormente sob a forma de massas irregulares com 6-25 células. As células conidiais individuais, com diâmetro de 3-6 μ m, globosas, subglobosas, ou ligeiramente irregulares a lobuladas, macias a finamente verrugosas, de cor castanho amarelado a castanho azeitona.

O Composto I pode ser produzido por cultura de Zalerion arboricola num meio nutritivo apropriado em condições descritas aqui a seguir e em seguida recuperando-o do meio de produção por extracção do componente activo a partir do meio de fermentação com um solvente apropriado, concentrando a solução contendo o componente desejado, e em seguida submetendo o material concentrado a separação cromatográfica a fim de separar o Composto I de outros metabolitos também presentes.

O Composto X que é o tema do requerimento copendente S.N. 362 647, registado em 7 de Junho, 1989 que é uma continuação de S.N. 105 795 registado em 10 de Outubro, 1987, agora abandonado, e aqui denominado como 1[(4R,5R)-4,5-dihidroxi-N²-(10,12-dimetil-1-oxo-tetradecil)-L-ornitina]-5-(treo-3-hidroxi-L-glutamina)equinocandina B também produzida pelo organismo.



Assim, a fim de favorecer a produção do Composto I, o meio nutritivo é modificado ou utiliza-se um método de síntese directa ou mais especialmente utiliza-se o mutante ATCC 20957 tal como é aqui a seguir descrito.

PRODUÇÃO

A produção do composto do presente invento pode ser realizada por qualquer um de entre vários métodos. Um método é dirigido à biossíntese, realizada substituindo no meio de fermentação, um amino ácido análogo não normalmente presente nesse meio como a fonte principal de azoto. Verificou-se que a incorporação de amino ácidos não naturais aqui a seguir referidos como "incorporação de análogo" ou "síntese dirigida" aumenta a formação de Composto I no meio de fermentação e constitui um aspecto do presente invento. Nessa síntese dirigida, o amino ácido não natural torna-se na fonte principal de azoto. Um dos amino ácidos mais eficazes para a direcção da síntese é 3,4-dehidroprolina.

Outros amino ácidos úteis incluem L-prolina e ácido L-azetidinam-2-carboxílico.

Quando se utiliza a incorporação de análogo, o meio pode ser um meio de outro modo convencional. Assim, como fontes de azoto podem existir para além dos amino ácidos não naturais, fontes complexas que fornecem azoto sob a forma de hidrolisados de levedura, autolisados de levedura, etc. Geralmente, as fontes de carbono incluem glicerol, açúcares, amidos e outros hidratos de carbono, ou derivados de hidrato de carbono tais como dextran, cerelese, assim como agentes nutritivos complexos tais como farinha de aveia, farinha de milho, milho-miúdo, trigo, etc. A quantidade exacta de fonte de carbono que é utilizada no meio dependerá, em parte, de outros ingredientes no meio, mas verifica-se habitualmente que uma quantidade de hidrato de carbono entre 0,5 e 40 por cento em peso do meio é satisfatória. Estas fontes de carbono podem ser usadas individualmente ou podem ser combinadas várias fontes de carbono no mesmo meio.

Entre os sais inorgânicos de agentes nutritivos, que podem ser incorporados nos meios de cultura encontram-se os sais habituais capazes de proporcionar sódio, potássio, magnésio, cálcio, fosfato, sulfato, cloreto, carbonato, e iões afins. São também incluídos metais vestigiais tais como cobalto, manganésio, ferro, molibdeno, zinco, cádmio, etc.

Meios úteis típicos são os que se seguem:

Meio I

Glicerol	85,0 g
Pectina	10,0 g
Farinha de Amendoim	4,0 g
Leite Peptonizado	4,0 g
Pasta de Tomate	4,0 g
Licor Saturado de Milho	4,0 g
Agua de Unto	4,0 g
Glicina	2,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
Agua Destilada	1.000 ml
pH=7,0 Pré Estéril	

Meio II

Cerelose	20,0 g
Farmamedia*	2,5 g
85% Lactato	2,0 g
KH_2PO_4	15,0 g
Elementos Vestigiais	10,0 ml
Agua Destilada	1000,0 ml
pH 7,0	

Elementos Vestigiais

Por litro de HCl 0,6N

FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,0 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,025 g
CaCl ₂	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,056 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,019 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g

* Pharmamedia é um meio nutritivo comercializado, cujo componente principal é proteína globular não hidrolisada derivada das sementes do algodão obtida a partir de Traders Protein, Buckeye Cellulose Corporation, Memphis, Tenn. 38108.

O composto 1 pode ser produzido pelo método de "incorporação análoga" de um modo mais ou menos como se segue: um recipiente congelado de Zalerion arboricola cultura ATCC 20868 é inoculado num meio de sementeira apropriado com pH variando entre 5 e 8,1, óptimamente entre 6 e 7,5, e feito crescer de 2 a 30 dias, de preferência de 2 a 5 dias, a temperaturas variando entre 15°C e 30°C, de preferência 25-26°C com ou sem agitação. A agitação, quando utilizada, pode ir até 400 rpm. de preferência 200 a 220 rpm. Quando o crescimento se torna abundante, a cultura é usada para inocular o meio a ser modificado por incorporação análoga e a ser cultivado para a produção do segundo metabolito.

O análogo é adicionado cinco dias após o crescimento se ter estabelecido numa quantidade que proporcione uma concentração final de 5-8 mg/ml.

A fermentação é realizada durante um mínimo de 14 dias a 25-26°C com agitação a 220 rpm.

No fim deste período, é extraída a totalidade do caldo com um volume igual de um solvente tal como cetona metil etílica. Outros solventes apropriados incluem acetato de etilo e acetona. O solvente é então removido sob pressão reduzida para se obter um resíduo que pode ser solubilizado com um volume conhecido de metanol, seco e ensaiado por HPLC, sendo o restante material submetido a processos de isolamento.

Quando não se utiliza a síntese directa como um método para a produção, podem ser utilizados materiais convencionais.

Assim, como fontes de azoto podem ser utilizados sais de amónio, amino ácidos tais como glicina, arginina, treonina, metionina, etc. assim como agentes nutritivos complexos tais como hidrolisados de levedura, autolisados de levedura, células de levedura, pasta de tomate, farinha de soja, hidrolisados de caseína, extractos de levedura, licores saturados de milho, destiladores solúveis, farinha de sementes de algodão, extracto de carne, etc. As várias fontes de azoto podem ser usadas isoladamente ou em combinação em quantidades variando entre 0,2 e 10 por cento em peso do meio.

Como fontes de carbono, podem ser utilizados materiais previamente detalhados, embora sejam preferidas composições contendo glicerol ou manitol. O Meio I, previamente descrito, ilustra um meio contendo glicerol. Os meios que se seguem, designados por RG2 e RG120 são ilustrativos dos meios contendo manitol:

MEIO RG2MEIO RG120

	por litro		por litro
Manitol	44 g	Manitol	91 g
Licor Saturado Milho	4 g	Licor Saturado Milho	4 g
Água de Unto	4 g	Água de Unto	4 g
Pectina	10 g	Pectina	10 g
KH_2PO_4	2 g	KH_2PO_4	2 g
Pasta de Tomate	4 g	Pasta de Tomate	4 g
Leite Peptonizado	4 g	Leite Peptonizado	4 g
Glicina	2 g	Glicina	2 g
Farinha de Amendoim	4 g	Farinha de Amendoim	4 g

pH ajustado para 7,0

pH ajustado para 7,0

Além disso, foi descoberto que pela utilização de certos meios contendo manitol, a produção do produto desejado pode ser aumentada. A produção aumentada pode-se manifestar no aumento de produção do Composto I em relação ao Composto X ou numa mais rápida formação de todos os metabolitos.

A taxa de produção pode ser aumentada várias vezes pela utilização de manitol numa quantidade de pelo menos 4 por cento em peso num meio com cuidadoso controlo do pH a cerca de 5,5 em que a fonte de azoto é caseína hidrolisada e base de azoto da levedura. Para a manutenção do controlo do pH crítico, é importante a presença de um tampão contendo fósforo, de preferência fosfato de potássio monobásico. Representativos de meios líquidos apropriados são os designados T6102 e T6103.

MEIO TG102

	por litro
D-Manitol	40 g
Bacto-Peptona	33 g
Extracto de	10 g
Bacto-Levedura	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
KH_2PO_4	9 g

sem ajustamento pH

MEIO TG103

	por litro
D-Manitol	40 g
NZ-Amina(tipo E)*	33 g
Extracto de	10 g
Fidco-Levedura	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
KH_2PO_4	9 g

sem ajustamento pH

* Hidrolisado de caseína,
Humko-Sheffield, Memphis,
Tenn.

Além disso, certos meios contendo manitol, favorecem a produção do Composto I do presente invento em relação ao Composto X que é normalmente o principal produto na cultura de Zalerion arboricola. Pela utilização destes meios, verificou-se que o rendimento do Composto I tinha aumentado significativamente. Assim, um meio que seja substancialmente neutro e que contenha D-manitol como fonte de carbono, um hidrolisado de proteína do leite (leite peptonizado) como uma fonte complexa de azoto, glicina como amino ácido e tampão, um tampão contendo fósforo e de preferência contendo também ácido láctico, elementos vestigiais, e óleos vegetais seleccionados. óleos apropriados são óleos de soja, amendoim e girassol. As variações úteis são as seguintes:



gramas/litro

D-manitol	20-100
KH_2PO_4	0,5-3
glicina	1-4
Leite peptonizado	2-20
Acido láctico	0-3
Elementos vestigiais (préviamente detalhados)	0-15 ml

óleo vegetal (soja, amendoim ou girassol)	0-20
--	------

pré-esterilização pH=7

Para melhor rendimento do composto, todos os componentes da composição anterior devem estar presentes. Assim, o meio S6 (abaixo) é um meio preferido.

MEIO S2

D-Manitol	44 g
KH_2PO_4	2 g
Glicina	2 g
Leite peptonizado	15 g
Acido láctico	2 g
Elementos vestigiais (detalhados préviamente)	10 ml

pré-esterilização
pH 7,0

MEIO S6

D-manitol	44g
KH_2PO_4	2 g
Glicina	2 g
Leite peptonizado	15 g
Acido láctico	2 g
Elementos vestigiais (detalhados préviamente)	10 ml

óleo de soja 10 g

pré-esterilização
pH 7,0

Para além dos meios líquidos, podem ser utilizados os meios sólidos. São representativos os que se seguem:

MEIO SÓLIDO F204

por frasco		<u>Base líquida</u>	
<u>250-ml</u>		<u>por litro</u>	
Milho-miúdo	15 g	Ardamine PH**	33,0 g
Base líquida	15 ml	Tartrato de Sódio	6,6 g
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,66 g
		Glutamato Monossódio	6,6 g
		Óleo de Milho	6,6 ml
sem ajustamento pH			

** (autolisado de levedura fornecido por Yeast Products Inc., Clifton, New Jersey)

MEIO SÓLIDO F4-SF

por frasco		<u>Base líquida</u>	
<u>250 ml</u>		<u>por litro</u>	
Milho estalado	15 g	Ardamine PH	0,2 g
Base líquida	10 ml	KH_2PO_4	0,1 g
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
		Tartrato de Sódio	0,1 g
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g

sem ajustamento do pH

Os meios anteriores podem ser utilizados em fermentações realizadas usando um processo padrão em que em primeiro lugar, micélio vegetativo congelado de Zalerion arboricola (ATCC 20868) é descongelado e usado para inocular um meio de sementeira o qual é então incubado durante um período mínimo de 3 dias a fim de produzir organismos que servem como sementes na produção do Composto I. O meio de sementeira pode ter a composição que se segue.

Meio de Sementeira (Meio KF)

Licor saturado de milho	5,0 g
Pasta de tomate	40,0 g
Farinha de aveia	10,0 g
Glucose	10,0 g
Elementos vestigiais*	10,0 ml
Água	1000 ml

pH=6,8

* previamente detalhado

Neste processo, uma secção inclinada de uma cultura preservada de ATCC 20868 é inoculada num meio de sementeira nutritivo líquido com pH variando entre 5 e 8,1, óptimamente entre 6 e 7,5 e os frascos são incubados com agitação a temperaturas variando entre cerca de 15°C e cerca de 30°C, de preferência entre 20° e 28°C. A agitação pode ir até 400 rpm, de preferência, cerca de 200 a 220 rpm. A incubação é realizada durante um período variando entre 2 e 30 dias, de preferência entre 2 e 14 dias. Quando o crescimento é abundante, usualmente entre 2 e 5 dias, o crescimento pode ser usado para inocular o meio de produção para a produção de Composto I. Contudo, de preferência, é realizado um segundo estadio de fermentação, inoculando com uma porção do crescimento da cultura e utilizando então condições

semelhantes mas geralmente com um período de incubação encurtado de cerca de 1 a 3 dias. O crescimento é então utilizado para inocular o meio de produção.

O meio de produção de fermentação inoculado com o crescimento da cultura é incubado durante 3 a 30 dias, usualmente 7 a 14 dias, com ou sem agitação. A fermentação pode ser realizada aeróbicamente a temperaturas variando entre cerca de 20°C e cerca de 40°C. Para resultados óptimos, é mais conveniente realizar estas fermentações a uma temperatura variando entre cerca de 24°C e cerca de 30°C. As temperaturas de cerca de 24°-28°C são as mais preferidas. O pH do meio nutritivo apropriado para a produção destes compostos pode variar entre cerca de 5,0 e 8,5 com uma variação preferida entre cerca de 6,0 e 7,5. Contudo, para uma produção rápida, o pH deve ser mantido muito próximo de cerca de 5,5. Após o período apropriado para a produção do composto ou compostos desejados, este(s) último(s) é (são) recuperado(s) do meio de fermentação tal como é aqui a seguir descrito com maior detalhe.

Além do que foi anteriormente referido, um método aperfeiçoado para a produção do Composto I utiliza um mutante específico de Zalerion arboricola na fermentação. O mutante específico foi obtido em primeiro lugar submetendo Z. arboricola 20868 a um agente mutagénico e isolando as colónias produzidas. Uma única colónia de entre cerca de oito colónias revelou ser útil na produção do Composto I como o componente principal.

Para a produção do mutante, pode ser utilizado qualquer um dos agentes habitualmente utilizados para a produção de mutantes. Assim, podem ser utilizados radiação ultravioleta, mutagénios químicos, ou agente de intercalação. Mutagénios

químicos apropriados incluem N-nitroso-N-metiluretano e N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina.

O mutante Z. arboricola útil no presente invento foi obtido tratando uma suspensão de esporos de Z. arboricola ATCC 20868 em tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 0,3 M pH=7 com N-nitroso-N-metiluretano, revestindo a suspensão tratada com agar de dextrose de batata e incubando a fim de desenvolver colônias, isolando em seguida as colônias, transferindo as colônias separadas para planos inclinados de agar de dextrose de batata e incubando durante 10 a 14 dias a 25°C a fim de se obter culturas de mutantes de Z. arboricola, uma das quais foi identificada experimentalmente como 27-9 e subsequentemente mantida como MF 5404 e depositada na coleção de cultura permanente da American type Culture Collection sendo-lhe atribuído o número de acesso ATCC 20957.

O mutante pode ser utilizado substancialmente do mesmo modo que o microorganismo afim. Assim, a fermentação utilizando este mutante pode ser realizada utilizando as condições anteriores de temperatura e de pH nos meios nutritivos anteriormente indicados, de preferência num dos meios identificados como S6, TG102 ou TG103 durante um período de tempo apropriado até cerca de 30 dias. Depois da cultura ficar completa, os produtos são recolhidos e o Composto I é isolado.

RECOLHA E ISOLAMENTO

Após produção por cultura utilizando um dos métodos anteriormente descritos, o Composto I é recolhido e isolado do meio.

Os passos exactos podem variar até um certo ponto dependendo da fermentação, se é realizada num meio sólido ou líquido, do solvente utilizado e do adsorvente ou combinação de adsorventes utilizado(s).

Quando a fermentação é realizada num meio sólido, o primeiro passo pode ser realizado adicionando um solvente alcoólico ao meio de fermentação, misturando completamente, e em seguida filtrando, recuperando e concentrando o filtrado de álcool aquoso. O filtrado concentrado pode ser em primeiro lugar extraído de novo ou lavado com um solvente hidrocarboneto alifático inferior tal como hexano ou outro alcano a fim de remover as impurezas solúveis no alcano. O filtrado lavado com alcano pode ser extraído ou dividido com um solvente orgânico oxigenado não miscível com a água e a solução resultante é concentrada, sendo então colocada sobre uma coluna cromatográfica durante pelo menos um, geralmente vários passos de separação. Colunas apropriadas são gel de sílica, gel de sílica de fase reversa e adsorvente dextrano "Sephadex" LH-20 (Pharmacia).

Quando a fermentação é realizada num meio líquido, num método, os sólidos miceliais são filtrados e recuperados do meio de fermentação. Adiciona-se álcool à massa micelial, e o sólido micelial é misturado completamente com o álcool, filtrado, e o filtrado é recolhido e concentrado. Num método alternativo, todo o caldo de fermentação pode ser extraído pela adição de um volume de alcanol, de preferência metanol, e filtrado a fim de remover as impurezas sólidas. O extracto de alcanol é então adsorvido sobre resina "Diaion" HP-20 (copolímero estireno-divinilbenzeno, Mitsubishi Chemical Industries, Ltd) e eluído com 100% de alcanol. Podem também ser utilizados "Diaion SP-207 (brominado) ou outro copolímero estireno-divinilbenzeno comercialmente disponível. Utiliza-se um segundo passo de diluição/adsorção

HP-20/eluição a fim de concentrar a amostra para separações cromatográficas. Por vezes, pode ser desejável um terceiro passo de diluição/adsorção HP-20/eluição para redução do volume.

O solvente alcoólico a ser utilizado na extracção inicial do agente activo a partir do meio nutritivo sólido ou a partir da camada micelial pode ser qualquer um dos alcoois inferiores tais como metanol, etanol, isopropanol, etc. É preferido o metanol.

Se o agente activo for dividido entre a solução de alcanol ou metanol, então os solventes apropriados são ésteres, tais como acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, ou cetonas, tais como cetona metil etílica.

A separação cromatográfica pode ser realizada utilizando cromatografia de coluna convencional com resina não-iónica ou por cromatografia líquida de elevada performance utilizando resina de fase reversa. As fracções contendo o Composto I anti-biótico podem ser detectadas pelo ensaio anti-fúngico usando Candida albicans. Geralmente, são utilizados mais de um passo de separação cromatográfica. Num processo mais preferido, são realizadas uma ou mais separações utilizando cromatografia de coluna e uma separação final é realizada utilizando cromatografia líquida de elevada performance (HPLC) com resina de fase reversa C₁₈.

Quando se utiliza cromatografia de coluna convencional para separações cromatográficas, o gel de sílica é o adsorvente preferido. Usualmente utiliza-se mais de uma separação cromatográfica. O gel de sílica pode ser usado em todas as separações embora se utilizem diferentes agentes de eluição. Contudo, pode-se combinar vantajosamente com a utilização de um adsorvente

diferente tal como o adsorvente dextrano vendido com o nome comercial de "Sephadex" LH-20. Podem também ser utilizados outros adsorventes tais como alumina, copolímeros estireno-divinilbenzeno disponíveis comercialmente como "Diaion" HP-20, HP-30, HP-40, SP-207 e "Amberlite" XAD-2, XAD-4, XAD-16 (Rohm and Haas Co.).

No fraccionamento e recuperação do componente activo por cromatografia sobre gel de sílica, misturas éster/alcool com concentrações progressivamente mais elevadas de alcool proporcionam boas separações. Verificou-se ser especialmente útil uma mistura de acetato de etilo e metanol. Estes podem ser utilizados em sistemas isocráticos de gradiente passo a passo ou de gradiente contínuo. Quando se utiliza um adsorvente dextrano tal como "Sephadex" LH-20, pode-se utilizar um sistema solvente clorohidrocarboneto/hidrocarboneto/alcool. Verificou-se ser especialmente útil uma mistura de cloreto de metileno/hexano/metanol.

Ao realizar a separação por HPLC, a solução alcoólica contendo material recuperado a partir de cromatografia convencional é concentrada e o resíduo é dissolvido em metanol/água na mesma relação que foi encontrada na fase móvel e colocado numa coluna envolvida com resina de fase reversa comercial ou numa coluna preenchida com gel de sílica/resina de fase reversa C₁₈ preparada tal como tem sido amplamente referido na bibliografia. Alternativamente, a solução alcoólica pode ser diluída até 52 por cento com água e bombeada para a coluna. A coluna é operada usando metanol/água (1:1 ou facultativamente outras relações) a 800-2.000 psi o que produz uma taxa de fluxo de cerca de 20 ml/min. A separação é monitorizada a 210 nm.

As fracções são ensaiadas quanto à sua actividade com Candida albicans e HPLC. O produto é recuperado a partir de

qualquer um dos processos cromatográficos combinando as fracções activas de Candida albicans e concentrando sob pressão reduzida.

Quando a fermentação é realizada usando o mutante, ATCC 20957, o processo de isolamento é basicamente o mesmo. Contudo, com a eliminação de um certo número de produtos menos importantes no processo usando o mutante, o processo de isolamento que utiliza processos cromatográficos é grandemente simplificado e o número de separações cromatográficas necessárias é grandemente reduzido.

As propriedades superiores do Composto I como um agente terapêutico no tratamento de infecções micóticas podem ser ilustradas com os resultados da concentração fungicida mínima (MFC) em testes contra Candida albicans, Candida tropicalis e Candida parapsilosis.

A actividade pode ser observada num ensaio de diluição de microcaldo de cultura utilizando como meio uma Base de Azoto da Levedura (Difco) com 1% de dextrose (YNBD). Ao realizar o ensaio, o Composto I foi solubilizado em 10 por cento de dimetil sulfóxido (DMSO) e diluído até 2.560 µg/ml. Os compostos foram posteriormente diluídos até 256 µg/ml em YNBD. Forneceu-se então 0,15 ml da suspensão à primeira fila de uma placa com 96 recipientes (contendo cada recipiente 0,15 ml de YNBD) resultando numa concentração da droga de 128 µg/ml. Foram então feitas diluições duas vezes a fim de se obter as concentrações finais da droga variando entre 128 e 0,06 µg/ml.

As culturas de levedura, mantidas em agar de dextrose Sabouraud foram transferidas para caldo de cultura YM (Difco) e incubadas durante a noite a 35°C com agitação (250 rpm). Após incubação, cada cultura foi diluída em água estéril para

proporcionar uma concentração final de $1-5 \times 10^4$ unidades formadoras de colónias (CFU)/ml.

Microplacas com 96 recipientes foram inoculadas usando um MIC-2000 (Dynotech) que fornece 1,5 µl por recipiente proporcionando um inóculo final por recipiente de $1,5-7,5 \times 10^3$ células. As microplacas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. As concentrações inibidoras mínimas (MICs) foram registadas como as concentrações mais baixas de droga que não apresentaram qualquer crescimento visível.

Após registo da MIC, as placas foram agitadas a fim de tornar a levar as células a suspensão. Em seguida, amostras de 1,5 µl a partir dos recipientes na microplaca com 96 recipientes foram transferidas para um único tabuleiro de recipiente contendo agar de dextrose Sabouraud. Os tabuleiros inoculados foram incubados 24 horas a 28°C sendo então avaliados. A MFC é definida como a concentração mais baixa da droga não apresentando qualquer crescimento ou menos de 4 colónias por mancha.

Concentração Fungicida Mínima	
Estirpe de	(µg/ml)
<u>Fungo No.</u>	<u>Composto I</u>
<u>Candida albicans</u>	
MY 1585	0,5
MY 1208	0,5
MY 1028	1,0
MY 1750	0,25
MY 1783	0,5

Candida tropicalis

MY 1012	2,0
---------	-----

Candida parapsilosis

MY 1009	8,0
MY 1010	8,0

Os resultados anteriores servem de exemplo das propriedades antimicóticas superiores e consistentes reveladas pelo Composto I.

O composto apresenta um valor potencial como uma substituição para um agente anti-fúngico conhecido o qual embora eficaz como agente anti-fúngico apresenta uma utilidade limitada pelo facto de ter um efeito lítico sobre os glóbulos vermelhos sanguíneos com níveis de dosagem baixos.

O composto é também um agente anti-fúngico de amplo espectro eficaz contra muitas espécies de fungos, tanto fungos filamentosos como leveduras.

O composto é útil para a inibição ou para o alívio das infecções pelo Pneumocystis carinii. Nessa utilização, o Composto I é administrado numa quantidade terapêuticamente eficaz ou inibidora a indivíduos infectados ou a indivíduos com compromisso imunitário susceptíveis de serem infectados com Pneumocystis carinii. A eficácia do Composto I para fins terapêuticos e anti-infecciosos pode ser demonstrada em estudos com ratinhos ou ratos com supressão imunitária.

Num estudo representativo dez ratinhos machos C3H/HeJ, pesando 22-24 g cada, foram submetidos a supressão imunitária pela adição de dexametasona à água para beber (8,0 mg/L) durante seis semanas a fim de induzir o desenvolvimento de infecções por P. carinii. Para favorecer a infecção os ratinhos foram também mantidos com uma dieta com baixo teor proteico. No início da sétima semana os ratinhos foram divididos em dois grupos. Ambos os grupos continuaram a receber dexametasona na água de beber e dieta de baixo teor proteico durante o restante tempo de estudo. Os ratinhos do Grupo I foram injectados intraperitonealmente duas vezes por dia com 0,5 ml de uma solução a 20% de DMSO como controlo do veículo. Os ratinhos do Grupo II foram injectados intraperitonealmente duas vezes por dia com 0,5 ml de água estéril contendo 0,0125 mg de Composto I (dissolvido em DMSO, sendo a concentração final de DMSO de 10%, dose real, 0,5 mg/kg). O período de tratamento durou duas semanas.

No fim do período de tratamento (uma supressão imunitária num total de oito semanas) os animais foram sacrificados sendo removido o tecido pulmonar. O tecido foi então tratado a fim de determinar o número de quistos para cada animal. O Composto I reduziu o número de quistos em 81% em comparação com os animais de controlo.

As notáveis propriedades são utilizadas com mais eficácia quando o composto é formulado em novas composições farmacêuticas com um veículo farmacêuticamente aceitável de acordo com técnicas de composição farmacêuticas convencionais.

As novas composições contêm pelo menos uma quantidade terapêutica anti-fúngica ou anti-pneumocystis em peso do composto activo. Geralmente, as composições contêm pelo menos 1 por cento em peso do Composto I. Composições concentradas apropriadas para

diluições antes da utilização podem conter 15 por cento ou mais e com algumas composições 90 por cento ou mais em peso. Ao preparar as composições, o Composto I é misturado intimamente com qualquer um dos meios farmacêuticos usuais.

As composições podem ser preparadas em formas de administração oral, parentérica, tópica ou pulmonar (inalação). A administração oral pode ser feita com preparações líquidas ou sólidas. Para as preparações líquidas, o agente terapêutico é formulado com veículos líquidos tais como água, glicóis, óleos, alcoóis, etc. Para preparações sólidas tais como cápsulas e comprimidos, o agente terapêutico é formulado com veículos sólidos tais como amidos, açúcares, caolino, celulose etilica, carbonato de cálcio e de sódio, fosfato de cálcio, caolino, talco, lactose, geralmente com um agente de lubrificação tal como estearato de cálcio, juntamente com agentes de ligação, agentes de desintegração, etc. Devido à sua facilidade de administração, os comprimidos e cápsulas representam a forma de dosagem oral mais vantajosa.

O composto I pode ser formulado em composições farmacêuticas para injeção. Além disso, pode ser apresentado sob a forma de unidade de dosagem, em ampolas ou em recipientes com doses múltiplas, e se necessário com a adição de um preservativo. As composições injectáveis podem apresentar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos tais como 0,85 por cento de cloreto de sódio ou 5 por cento de dextrose em água, ou podem ser solubilizadas em álcool/propilene glicol ou polietilene glicol e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão. Podem ser adicionados agentes também assim como outros aditivos. Alternativamente, os ingredientes activos podem apresentar-se sob

a forma de pó para reconstituição com um veículo apropriado antes da administração.

As composições podem ser formuladas sob a forma de unidade de dosagem. A expressão "forma de unidade de dosagem" tal como é usada na apresentação detalhada e nas reivindicações refere-se a unidades fisicamente descontínuas, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de ingrediente activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico. Exemplos dessas formas de unidade de dosagem são comprimidos, cápsulas, pílulas, pacotes de pó, hóstias, unidades medidas em ampolas ou em recipientes de doses múltiplas, etc. Uma unidade de dosagem do presente invento pode conter, dependendo da utilização de 35 a 200 miligramas ou mais do componente droga.

Se a aplicação for tópica, a droga deverá ser formulada em cremes e unguentos convencionais tais como petrolatum, lanolina anidra, álcool cetílico, creme cosmético de limpeza, monosteato de glicerilo, água de rosas, etc. Usualmente prepara-se uma solução de creme a 1 ou 2 por cento que é aplicada à região a ser tratada.

Para utilização anti-pneumocystis, a administração por inalação pode ser particularmente útil. Para administração por inalação, o Composto I pode ser administrado sob a forma de uma pulverização de aerosol a partir de embalagens ou nebulizadores pressurizados. Os compostos podem também ser administrados sob a forma de pós que podem ser formulados e a composição do pó pode ser inalada com o auxílio de um dispositivo de inalação de pó por insuflação. O sistema de administração preferido para inalação é constituído por um aerosol para inalação de dose medida (MDI), que pode ser formulado como uma suspensão ou como uma solução do

Composto I em propulsores apropriados, tais como fluorocarbonetos ou hidrocarbonetos.

Devido à difícil solubilidade do composto em veículos líquidos farmacêuticamente aceitáveis e devido ao facto de ser desejável tratar o pulmão e os bronquios directamente, a administração de aerosol constitui um método de administração preferido. A insuflação é também um método desejável, especialmente quando a infecção se possa ter espalhado para os ouvidos ou outras cavidades do corpo.

Para aplicação não médica, o produto do presente invento pode ser utilizado em composições num veículo inerte o que inclui diluentes sólidos ou líquidos secos finamente divididos, agentes de extensão, agentes de enchimento, condicionadores e excipientes, incluindo várias argilas, terra diatomácea, talco, etc., ou água e vários líquidos orgânicos tais como alcanóis inferiores, por exemplo etanol e isopropanol, ou querosene, benzeno, tolueno e outras fracções da destilação do petróleo ou suas misturas.

Na prática do invento, uma quantidade anti-fúngica das composições pode ser aplicada directamente às zonas onde se deseja obter o controlo dos fungos.

Os exemplos que se seguem ilustram o invento mas não são elaborados de modo limitativo:

Exemplo I

Foi utilizada na fermentação uma cultura congelada de Zalerion arboricola MF-5171, ATCC No. 20868, mantida na coleção de culturas da Merck.

Todo o plano inclinado de uma cultura congelada com 2,5 ml foi descongelado e transferido assépticamente para um frasco com três divisórias de 250 mililitros contendo 40 mililitros de Meio I (composição previamente detalhada).

O Meio I, inoculado com cultura, foi incubado a 26°C durante cinco dias com agitação a 220 rpm a fim de se obter um caldo maduro para sementeira.

Os caldos de cultura semeados foram preparados de um modo semelhante a partir do Meio II da composição também previamente detalhados. As sementeiras do Meio I e do Meio II foram então inoculadas em 7,5 mililitros de Meio I e de Meio II, respectivamente, a um nível de 5 por cento e incubadas a 26°C a fim de estabelecer o crescimento. No fim deste período, foram adicionados os amino ácidos que se seguem aos tubos separados de cada meio: L-prolina, D-prolina, ácido L-azetidina-2-carboxílico, e 3,4-dihidro-L-prolina, e Composto X como controlo. Os tubos foram incubados a 26°C a 220 rpm durante 14 dias.

No fim deste período o caldo em cada um dos tubos foi diluído com um volume igual de metanol, sendo a mistura homogenizada e clarificada por filtração. A mistura de metanol foi submetida a pressão reduzida a fim de remover o metanol e recuperar um resíduo o qual foi então extraído duas vezes com 10 mililitros de acetato de etilo. A solução de acetato de etilo foi seca sobre sulfato de magnésio.

Em operações separadas, as soluções secas foram concentradas até à secura e reconstituídas com 0,5 ml de metanol. Cada solução resultante foi diluída 1:5, e 10 µl da solução diluída foram utilizados num ensaio HPLC analítico sobre uma coluna de "Zorbax" ODS (DuPont) usando acetonitrilo/água 1:1 com Composto X que tinha tempos de retenção de 8,38 minutos (Meio I) e 8,29 minutos (Meio II) como controlos. O tubo do Meio I ao qual se tinha adicionado L-prolina e 3,4-dehidro-L-prolina e o tubo do Meio II ao qual se tinha adicionado L-prolina, ácido L-azetidiner-carboxílico e 3,4-dehidro-L-prolina revelaram picos de retenção variando entre os 7,39-7,48 minutos para além de um tempo de retenção de 8,28-8,38 minutos atribuível ao Composto X.

Os ensaios de HPLC bioautográficos foram também realizados nas mesmas amostras de fermentação de 10 µl que tinham sido usadas para HPLC analítica. Foram usados 10 microlitros de amostra por injeção fazendo-se a eluição com acetonitrilo/água (1:1) com uma taxa de fluxo de 1 ml/min e 200 microlitros/corte com um volume de vácuo de 1,5 mililitros. As fracções foram recolhidas numa placa de microtitulação, com 96 recipientes. O solvente da HPLC foi evaporado e adicionou-se a cada recipiente 0,2 mililitros de caldo de dextrose de batata que tinha sido inoculado com Candida albicans MY-1028 e feito crescer durante 24 horas. Actividade para além da atribuível ao Composto X foi encontrada na amostra obtida a partir do meio ao qual se tinha adicionado 3,4-dehidro-L-prolina na fracção, o que corresponde a um pico encontrado aos 7,57 minutos. Este pico corresponde aos 7,39 a 7,48 minutos encontrados na avaliação analítica de HPLC.

Uma pequena quantidade do composto foi isolada a partir da determinação bioautográfica por HPLC. O espectro de massa FAB deste constituinte menos importante a partir da biossíntese

 - 33 -

dirigida usando 3,4-dehidro-L-prolina revelou um iço molecular com menos 14 unidades de massa do que o Composto X.

Exemplo II

Fermentação

Os conteúdos de um frasco congelado (aproximadamente 2 mililitros) de cultura MF 5171 (Zalerion arboricola) foram inoculados em 54 mililitros de meio de sementeira KF num frasco de Erlenmeyer de 250 mililitros sem divisórias. A cultura foi incubada a 25°C durante 3 dias a 220 rpm num agitador recíproco. Uma amostra da cultura (5 ml) foi inoculada num frasco de Erlenmeyer sem divisórias de 2 litros contendo 500 mililitros de meio de sementeira KF e cultivada a 25°C durante três dias com agitação a 220 rpm.

No fim deste período de três dias, 5 mililitros de cultura foram inoculados em cada um dos cinco frascos de Erlenmeyer sem divisórias de 2 litros contendo 500 mililitros do meio de sementeira e cultivados a 25°C durante 3 dias a 220 rpm. Estes frascos foram reunidos e inoculados num recipiente agitado de 75 litros contendo 50 litros do meio de produção com a composição que se segue:

Meio de Produção

<u>Material</u>	<u>Concentração (g/L)</u>
Licor daturado de milho	5,0 mL
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
Água de unto	5,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,0 mg
óleo de fígado de bacalhau	2,0 mL
Pasta de tomate	5,0
Citrato de Na	2,0
Glicerol	75,0
Poli-etilene glicol 2000	2,0 mL

pH = 7,0 antes da esterilização a 121°C durante 35 minutos.

A cultura foi mantida durante 8 dias a 25°C com uma taxa de agitação de 300 rpm e um fluxo de ar de 5 litros/minuto. Em seguida, o caldo de fermentação foi recolhido para isolamento.

Isolamento

O caldo de cultura total do lote de fermentação de 70 litros anterior foi filtrado e a massa micelial foi extraída com 10 litros de metanol. O extracto de metanol foi filtrado e diluído com 10 litros de água e adsorvido para 1,2 litros de resina HP-20 e eluído com 100% de metanol. O corte rico em metanol, com um valor de 1.500 mililitros, foi concentrado até 150 mililitros.

O concentrado foi diluído até uma mistura de 40% de metanol/60% de água e adsorvido em 200 mililitros de HP-20. A coluna foi lavada sucessivamente com metanol/água (50:50), água,

e acetonitrilo/água (25:50), sendo então os metabolitos eluidos da coluna com acetonitrilo/água (50:50).

Setenta mililitros dos 400 mililitros do corte da adsorção em HP-20, rico em actividade biológica, foi diluído até 300 mililitros com água, filtrado e carregado com uma taxa de fluxo de 10 ml/min para uma coluna de "Zorbax" ODS de 88 mililitros que tinha sido equilibrada com acetonitrilo/água (12,5/87,5). A coluna foi eluída com uma taxa de fluxo de 20 mililitros/minuto com acetonitrilo/água (40/60), seguindo-se acetonitrilo/água (50/50). Os compostos foram eluidos com acetonitrilo/água 50/50. A coluna foi monitorizada por meio de UV a 210 nm e os ensaios anti-fúngicos com Candida albicans MY-1028, e as avaliações por meio de HPLC analítica foram realizados nas fracções. Tendo como base estas análises, certas fracções foram combinadas.

Uma amostra das fracções combinadas após concentração até à secura e avaliação por HPLC analítica revelou ser constituída por uma mistura 1:1 de Composto X e de Composto I.

A amostra anterior cujo teor ia até cerca de 7,5 mg de Composto X e 7,5 mg de Composto I em 3,2 mililitros de metanol foi diluída até 10 mililitros com água e injectada numa coluna "Dynamax"-60 ABµM C18 21,4 mm ID x 25 cm (equipada com uma coluna de vigia de 5 cm (Rainin Instrument Co., Inc. Woburn, MA)) que tinha sido previamente equilibrada com acetonitrilo/água (60/40). A mistura foi então eluída com o mesmo eluente acetonitrilo/água a 10 mililitros/minuto à temperatura ambiente e foram recolhidas fracções cada uma delas com 15 mililitros. Trinta minutos após a injeccção, foi iniciado um gradiente linear durante 60 minutos o qual aumentou a concentração de acetonitrilo de 40 por cento para 60 por cento. As avaliações a 210 nm e a subsequente análise por

HPCLC dos cortes indicou que existiam três fracções contendo Composto I. A fracção mediana contendo a maior parte do Composto I e a sua porção mais pura foi concentrada até à secura e foi feita uma determinação espectral da massa preliminar.

Os espectros de massa por bombardeamento atómico rápido litiado (FAB-MS) indicou um peso molecular de 1064. Os espectros de massa por cromatograma gasoso (GC-MS) do derivado trimetilsilílico (TMS) do hidrolisado ácido total indicaram como componentes principais a treonina, 4-hidroxiprolina, um produto de oxidação do composto afim da ornitina, ácido 3-hidroxi-glutâmico, um ácido gordo C_{16} e 3-hidroxiprolina. Na base desta análise, foi proposta a estrutura do Composto I.

O componente desta fracção foi ainda purificado dissolvendo a fracção em 33 μ l de metanol, 100 μ l de água e 10 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) e cromatografando a solução resultante numa coluna de Dynamax-60 A C18 10 mm ID 25 cm que tinha sido equilibrada com 55% de 0,1% de TFA em água/45% de acetonitrilo. A eluição com o mesmo sistema solvente a 4 ml/min à temperatura ambiente levou três fracções a terem um pico de adsorção 210 nm. Duas das fracções foram evaporadas até à secura e analisadas por 1H RMN. 1H RMN preliminar apoiou a fórmula do Composto I.

Uma amostra purificada do composto I tem os dados espectrais de massa previamente detalhados de 1H RMN da Figura 1 e de ^{13}C RMN.

EXEMPLO III

Cinquenta mililitros de meio de sementeira KF num frasco de Erlenmeyer sem divisórias foram inoculados com frasco congelado de Z arboricola e agitados a 220 rpm e 25°C durante 72 horas. Dois mililitros desta sementeira foram usados para inocular 50 mililitros de meio KF e foram feitos crescer durante 72 horas. O segundo estadio foi usado para inocular o meio de produção.

Quarenta mililitros de meio previamente detalhado como meio S-6 em frascos de Erlenmeyer sem divisórias de 250 mililitros foram inoculados com 2 mililitros de sementeira e os frascos foram agitados a 220 rpm e 25°C durante 14 dias. Reuniu-se um total de 125 frascos a fim de se obter 5 litros do caldo de cultura final.

O caldo de cultura total foi filtrado sob vácuo através de uma camada com 1 polegada de "Super-Cel" (Manville). Não foi detectada qualquer actividade no caldo de cultura filtrado. A massa micelial foi extraída com 1 litro de metanol durante a noite com agitação. O extracto de metanol foi ensaiado quanto à presença de componentes bioactivos usando um ensaio de difusão em disco com C. albicans MY 1028 e ensaio com HPLC (acetonitrilo/fosfato de potássio 0,01 M 50/50, pH 7,0) e comparando os resultados com uma amostra obtida previamente do Composto X como padrão. O extracto de metanol foi diluído até uma concentração final de metanol aquoso a 50 por cento e adsorvido numa coluna HP-20 de 200 mililitros com uma taxa de fluxo de 20 ml/min. A coluna foi lavada com três volumes da coluna de metanol aquoso a 50 por cento. A actividade foi eluída com seis volumes da coluna de metanol aquoso a 75 por cento. Os componentes desejados foram as



fracções apropriadas com Composto I e Composto X foram combinados até 1,7 litros.

A amostra contendo componentes bioactivos foi diluída com 1,7 litros de água para obter uma composição metanol/água 50:50 e a composição foi filtrada a fim de remover partículas insolúveis. Esta preparação foi então adsorvida numa coluna "Zorbax" 0,05 de 98 mililitros (pré-equilibrada com metanol/água 50:50) a 20 ml/min. A coluna foi eluída com acetonitrilo/água 45:55 a 20 ml/min; foram colhidas fracções de vinte mililitros após um volume de vácuo de 30 mililitros. A cromatografia foi monitorizada por meio de UV a 210 nm, por meio de HPLC analítica e por meio de bioensaio anti-fúngico (C. albicans MY 1028). Certas fracções foram combinadas, tendo como base principalmente HPLC analítica; uma mistura de Composto I e de Composto X que ia até 80 miligramas revelou conter 19,8 miligramas de Composto I.

EXEMPLO IV

Os conteúdos de um frasco de micélio vegetativo congelado de Zalerion arboricola, ATCC 20868, foram descongelados e usados para inocular 54 mililitros de meio de sementeira KF o qual foi então incubado durante 3 dias a 25°C a 220 rpm num agitador rotativo com um lançamento de 5 centímetros a fim de produzir uma cultura de sementeira.

Porções de dois mililitros de cultura de sementeira foram inoculadas num frasco de Erlenmeyer de 250 mililitros contendo 50 mililitros de meio TG103 e incubadas durante 5 dias a 25°C com agitação.

No fim deste período, o caldo de fermentação foi recolhido. Ao ser recolhido, a cultura líquida foi centrifugada a fim de separar as células da cultura flutuante. As células foram misturadas com uma porção de 20 ml de metanol e a extracção foi deixada continuar durante a noite à temperatura ambiente. Os sólidos foram removidos por centrifugação, e o extracto metanólico foi então injectado numa coluna "Ultrasphere" (Beckman Engineering) de 5 μ (4,6 mm x 25 cm) que foi eluída isocráticamente com acetonitrilo/água 48/52 com uma taxa de fluxo de 0,75 ml/min. O efluente foi monitorizado a 210 nm, e foram recolhidas fracções de 0,25 ml em placas de microtitulação com 96 recipientes. O solvente foi removido a partir das placas in vacuo, e as placas foram ensaiadas quanto à biocatividade colocando em cada recipiente um extracto de levedura, peptona, caldo de dextrose (YEPD) e da composição que se segue:

	<u>g/litro</u>
Extracto de levedura Bacto	10
Peptona Bacto	20
Dextrose	20
sem ajustamento do pH	

que tinha sido semeada com Candida albicans MY 1028 e incubando durante a noite a 37°C. Os resultados revelaram a produção do Composto I. O Composto X é também produzido.

EXEMPLO V

Foram preparados frascos de 250 mililitros contendo 54 mililitros de Meio de sementeira KF (préviamente indicado) e inoculados a partir de um plano inclinado de agar de MF5404 Z. arboricola ATCC 20957 e incubados a 25°C durante quatro dias a 220 rpm. Foi usada uma amostra de 20 mililitros para inocular cada um de quatro frascos de 2 litros contendo 500 ml de meio KF. Os frascos foram incubados a 25°C durante três dias a 220 rpm. Os conteúdos dos frascos foram então reunidos para utilização como um inóculo para um fermentador de sementeira de 300 litros contendo 180 litros de meio KF e 2 ml/litro de polipropilene glicol P-2000 (Dow Chemical Co.) adicionados para reduzir a formação de espuma. O fermentador da sementeira foi operado durante três dias a uma temperatura de 25°C, um fluxo de ar de 90 litros/min, uma pressão de calibre 0,7 kg/cm², e uma velocidade de agitação de 200 rpm. Foi usada uma amostra de 25 litros para inocular um fermentador de produção de 800 litros contendo 475 litros de Meio TG103 da composição préviamente indicada mas aos quais tinham sido adicionados 2 ml/litro de polipropilene glicol P-2000 e esterilizados a 120°C durante 25 minutos. A fermentação foi realizada durante cinco dias a uma temperatura de 25°C, com um fluxo de ar de 250 litros/minuto, uma pressão de calibre 0,7 kg/cm², e uma velocidade do agitador de 150 rpm. Deixou-se o pH descer para um valor inicial de 6,0 a 5,5, sendo então mantido a 5,5 ± 0,4 usando NaOH e H₂SO₄. Após cinco dias o caldo dos dois lotes foi recolhido para isolamento do produto.

Setecentos e cinquenta litros de metanol foram adicionados a 750 litros de caldo total de fermentação e a mistura foi agitada durante 8 horas. O extracto do caldo de fermentação total foi centrifugado a fim de remover os sólidos de fermentação

insolúveis e para proporcionar 1436 litros de produto flutuante clarificado, cujo pH foi ajustado para pH 7.

Uma camada de 77 litros de "Diaion" SP-207 (Mitsubishi Chemical Industries) foi preparada lavando com metanol e pré-equilibrando com metanol água 50:50 (MeOH/H₂O). O produto flutuante clarificado foi então carregado para SP-207 numa direcção do fluxo para cima com uma taxa da camada fluidificada de 5,7 litros por minuto. Após carregamento, a coluna foi lavada com 567 litros de metanol água 65:35 e eluída com 454 litros de metanol a 100%.

Os cortes SP-207 MeOH/H₂O/H₂O 65:35 e 100% MeOH da coluna SP-207 foram combinados e ajustados até uma composição de MeOH/H₂O 50:50 pela adição de H₂O para proporcionar um corte rico de 945 litros. Este corte rico foi carregado numa coluna "Diaion" HP-20 de 108 litros (lavada com metanol e pré-equilibrada com MeOH/H₂O 50:50) com uma taxa de fluxo de 2-4 litros por minuto. A resina foi então lavada com 567 litros de MeOH/H₂O 65:35 e eluída com 454 litros de 100% de MeOH.

O corte de HP-20 rico em Composto I foi concentrado até um volume de 6 litros, por meio de uma primeira diluição com H₂O e em seguida por adsorção e eluição a partir de uma coluna HP-20 mais pequena (10 litros) de um modo semelhante ao utilizado na coluna HP-20 maior.

Dois litros (de um total de 6 litros) do corte rico de HP-20 concentrado foram diluídos com 2 litros de água e carregados num sistema HPLC Preparativo 800A (Tecnologia de Separações) equipado com uma coluna C18 de 3,9 litros (Amicon) pré-lavada com MeOH e pré-equilibrada com MeOH/H₂O 50:50. A carga foi seguida por 500 mililitros de MeOH/H₂O 50:50 e eluída com uma taxa de fluxo de 212 ml/min com um gradiente linear a partir de MeOH/H₂O

50:50 a 100 por cento de MeOH num período de tempo de 60 minutos. As fracções foram analisadas por meio de HPLC, combinadas e concentradas até à secura para proporcionarem aproximadamente 20 gramas de Composto I com 88 por cento de pureza.

Exemplo VI

A partir do concentrado de 6 litros do corte de HP-20 rico em Composto I obtido tal como foi descrito no Exemplo V, foram retirados 900 mililitros para purificação.

A 900 mililitros adicionou-se um volume igual de metanol e adicionaram-se à solução resultante 900 mililitros de água, 900 mililitros de hexano e 900 mililitros de acetato de isopropilo agitando-se vigorosamente. Resultou uma emulsão inseparável, adicionando-se então 450 mililitros de metanol para se obter duas camadas. A camada inferior com 2,5 litros foi adicionada a 900 mililitros de hexano, 900 mililitros de acetato de isopropilo e 450 mililitros de metanol e de novo agitação vigorosa recuperando-se uma camada inferior de 3 litros. O passo de separação foi realizado uma terceira vez na camada inferior a fim de gerar uma outra camada inferior de 3 litros.

A camada inferior final a partir das experiências de separação foi concentrada até à secura. O resíduo (4 gramas) foi adicionado a 50 mililitros de uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/5\%\text{CH}_3\text{COOH}$ (72,5/27,5/10) e em seguida foi dissolvido na camada inferior. Esta solução foi cromatografada sobre 2 litros de gel de sílica (malha 230-400) a 50 ml/min usando o mesmo $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/5\%\text{CH}_3\text{COOH}$ (72,5/27,5/10) (72,5/27,5/10) como a fase móvel para se obter Composto I de elevada pureza separado de componentes menos importantes.

Exemplo VII

1.000 comprimidos prensados contendo cada um miligramas de Composto I são preparados a partir da formulação que se segue:

	<u>Gramas</u>
Composto I	500
Amido	750
Fosfato de cálcio dibásico hídrico	5.000
Estearato de cálcio	2,5

Os ingredientes reduzidos a pó fino são bem misturados e granulados com 10 por cento de pasta de amido. A granulação é seca e prensada em comprimidos.

Exemplo VIII

1.000 cápsulas de gelatina dura, contendo cada uma 210 miligramas de Composto IA são preparadas a partir da formulação que se segue:

<u>Composto</u>	<u>Gramas</u>
Composto I	500
Amido	250
Lactose	750
Talco	250
Estearato de cálcio	10

é preparada uma mistura uniforme dos ingredientes por mistura que é usada para introduzir em cápsulas de gelatina dura de duas peças.

Exemplo IX

Um unguento apropriado para aplicação tópica pode ser preparado dispersando intimamente 13 miligramas de Composto I em 1 grama de gel polietileno/hidrocarboneto comercialmente disponível.

Exemplo X

Uma suspensão injectável (IM) pode ser preparada como se segue:

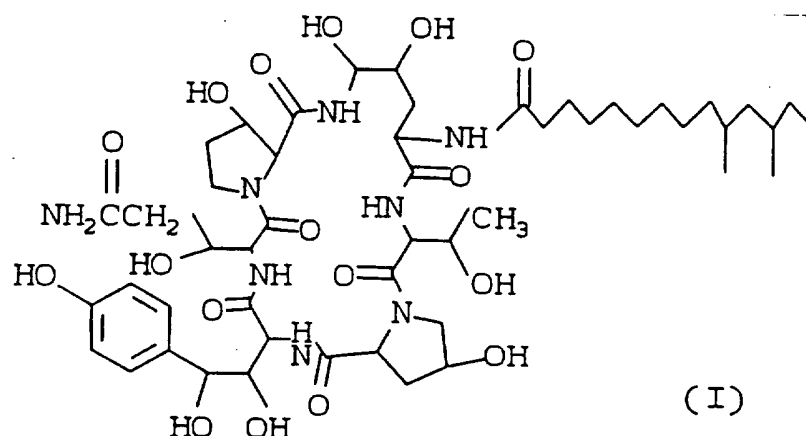
	<u>mg/ml</u>
Composto I	10,0
Celulose metílica	5,0
Tween 80	0,5
Alcool benzílico	9,0
Cloreto de benzalcónio	1,0
Água	até 1 ml

Exemplo XIPor Lata

Composto I	24 mg
Concentrado líquido de	1,2 mg
Lecitina NF	
Triclorofluorometano	4,025 g
Diclorodifluorometano	12,15 g

REIVINDICAÇÕES

1a. - Método para a produção de um composto tendo a fórmula



caracterizado por compreender a cultura de Zalerion arboricola num meio nutritivo em que esteja presente um aminoácido não natural como fonte principal de azoto.

2a. - Método para a produção do composto da Reivindicação 1, caracterizado por compreender a cultura de Zalerion arboricola ATCC 20868 num meio nutritivo enriquecido em manitol como a principal fonte de carbono.

3a. - Método para a produção do composto da Reivindicação 1 com um rendimento aumentado, caracterizado por compreender a cultura de Zalerion arboricola num meio nutritivo aquoso que contem:

(1) uma fonte de carbono compreendendo manitol,

(2) uma fonte de azoto compreendendo um hidrolisado de proteína do leite, e

(3) um tampão compreendendo glicina ou um fosfato inorgânico.

4a. - Método de acordo com a Reivindicação 3, caracterizado por o meio nutritivo utilizado conter também elementos vestigiais e ácido láctico.

5a. - Método de acordo com a Reivindicação 4, caracterizado por o meio nutritivo utilizado conter, adicionalmente, um óleo vegetal seleccionado de entre óleos de soja, amendoim ou girassol.

6a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por o composto preparado ser denominado por 1-[4,5-di-hidroxi-N²-(10,12-dimetil-1-oxotetradecil)-ornitina]-5-(3-hidroxi-glutamina)-6-[3-hidroxi-prolina]lequinocandina B.

7a. - Processo para a preparação de uma composição, caracterizado por se incluir na referida composição o composto preparado de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6, misturado com um veículo farmacêuticamente aceitável.

8a. - Processo de acordo com a Reivindicação 7, caracterizado por se preparar uma composição que é útil para a inibição do crescimento dos fungos.

9a. - Processo de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado por se preparar uma composição que é útil para o tratamento de Pneumocystis carinii.

10a. - Método para a inibição do crescimento dos fungos, caracterizado por compreender a aplicação à superfície onde o seu crescimento deva ser controlado de uma maneira eficaz contra os fungos do composto preparado de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6, sendo a gama de dosagem eficaz de 5 a 10 mg por quilograma duas vezes ao dia durante 4 dias.

11a. - Método para o tratamento de ou para a prevenção de infecções pelo *Pneumocystis carinii* em mamíferos, caracterizado por compreender a administração a mamíferos de uma quantidade anti-infecciosa do composto preparado de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6, sendo a gama de dosagem eficaz de 1 a 10 mg por quilograma quatro vezes ao dia.

12a. - Processo para a preparação de um meio nutritivo útil para a produção de rendimentos aumentados do composto preparado de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6, caracterizado por se incluir no referido meio nutritivo, em gramas por litro de meio aquoso: D-manitol, 20-100; KH_2PO_4 , 0,5-3; glicina, 1-4; leite peptonizado, 2-20; ácido láctico, 0-3; solução de elementos vestigiais, 0-15 ml; e óleo vegetal, 0-20.

13a. - Método para aumentar a taxa de produção do composto de fórmula (I), referida na reivindicação 1, caracterizado por compreender a cultura de Zalerion arboricola em meio nutritivo que contem manitol numa quantidade de pelo menos 4 por cento em peso e mantendo o pH a cerca de 5,5.

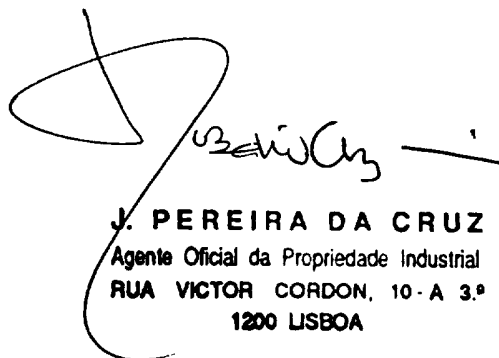
14a. - Processo para a preparação de um meio nutritivo útil para aumentar a taxa de produção do composto com a fórmula I, referida na Reivindicação 1, caracterizado por se incluir, no referido meio nutritivo, carbono assimilável, azoto assimilável e

sal orgânico que contenha pelo menos 4 por cento em peso de manitol e um tampão para manter o pH a cerca de 5,5.

15a. - Método para produzir um composto com a fórmula (I) referida na Reivindicação 1, como o produto principal, caracterizado por compreender a cultura de MF 5404 Zalerion arboricola ATCC 20957 num meio nutritivo contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e sais inorgânicos em condições aeróbicas até ser produzida uma quantidade suficiente do composto com a fórmula (I) separando em seguida o produto do meio.

Lisboa, 29 de Junho de 1990

O ADJUNTO



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

11

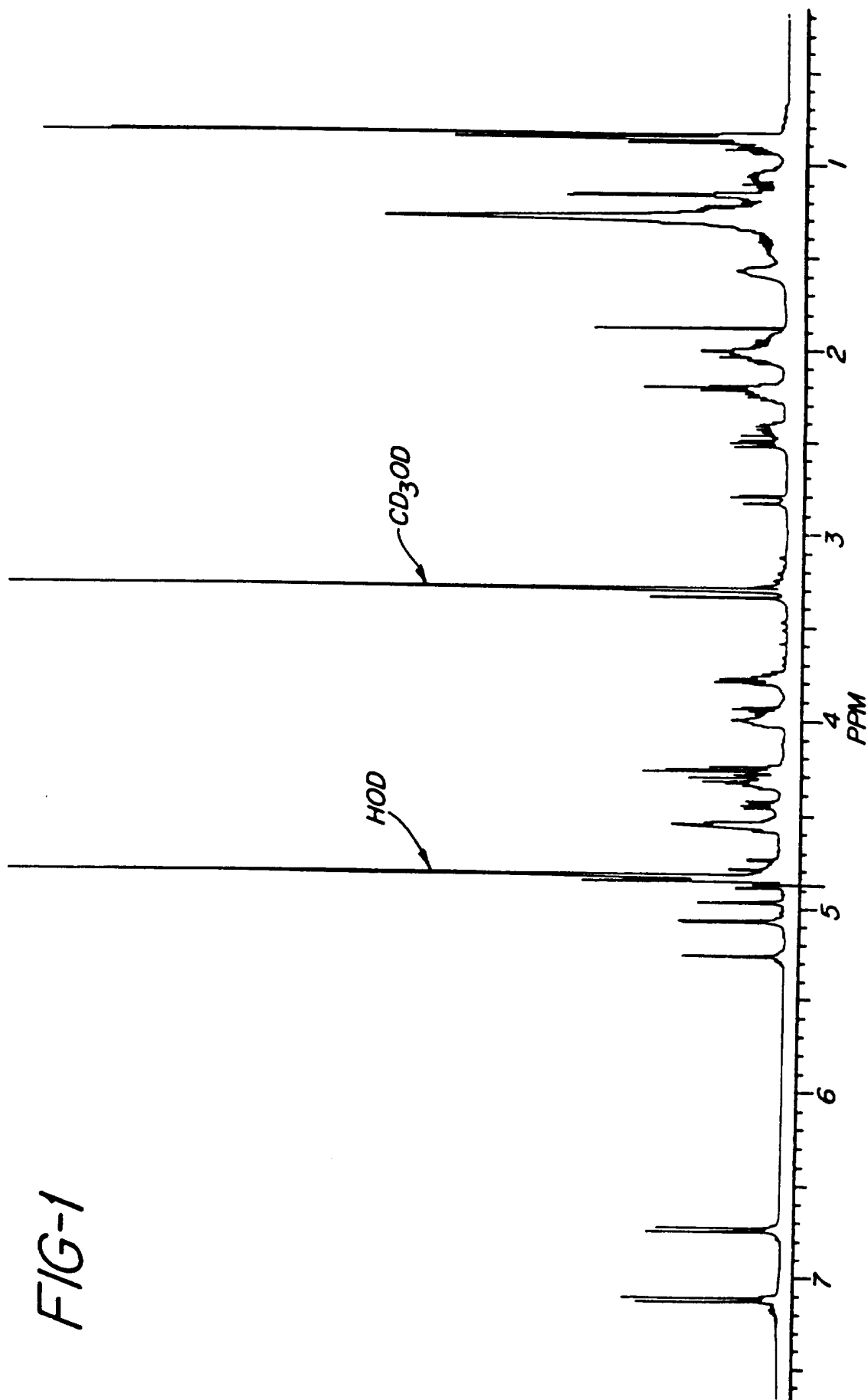


FIG-1