

Handwritten mark

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 390

REQUERENTE: ABBOTT LABORATORIES, norte-americana, com sede em One Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064-3500, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de produção de derivados da eritromicina e de microorganismos geneticamente modificados"

INVENTORES: J. Mark Weber e James B. McAlpine

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

Estados Unidos da América em 18 de Abril de 1990 sob o n.º 510 483



MEMORIA DESCRITIVA

CAMPO TECNICO

O presente invento refere-se a uma nova classe de derivados da eritromicina. Em particular, o presente invento refere-se a compostos de 6-desoxi-eritromicina, à utilização destes compostos como antibióticos e a um processo para a sua preparação.

ANTECEDENTES DO INVENTO

As eritromicinas, e em particular a eritromicina A, são antibióticos macrólidos de largo espectro, clinicamente úteis, produzidos pela bactéria gram-positiva Saccharopolyspora erythraea (anteriormente Streptomyces erythreus). Contudo, uma grande desvantagem das eritromicinas é a sua fraca estabilidade em meios ácidos, a qual pode ocasionar absorção oral irregular e diminuída.

Sintetizaram-se quimicamente numerosos derivados da eritromicina numa tentativa de produzir compostos com estabilidade em meios ácidos melhorada sem perda da actividade antibacteriana. Descreveu-se a (9S)-9-di-hidro-eritromicina A (a qual possui um grupo 9-hidroxi em vez do grupo 9-ceto) (Wiley e colab., J. Amer. Chem. Soc., 77:3676-3677 (1955)). Também foram descritas a eritromicilamina e a oxima de eritromicina nas quais o grupo 9-ceto é substituído, respectivamente, por um grupo amino ou um grupo oxima (GB 1 100 504; Massey e colab., Tetrahedron Letters, 2; 157-160 (1970)), assim como vários éteres de oxima de eritromicina (U.S. 3 681 326, U.S. 3 869 445 e U.S. 4 063 014). A 6-O-metil-eritromicina (claritromicina) e a 6,11-di-O-metil-eritromicina A estão descritas na U.S. 4 743 593.

Embora os derivados anteriores apresentem estabilidade em meios ácidos melhorada, os processos sintéticos pelos quais eles são produzidos são dispendiosos e podem produzir rendimentos baixos. Além disso, a instabilidade em meios ácidos do material de partida (isto é, a eritromicina) dificultou os esforços para sintetizar derivados mais activos.



um intermediário na via biossintética da eritromicina. Numa concretização particular do invento, o ADN do microorganismo a ser modificado encontra-se na região genómica responsável pela hidroxilação do 6-desoxi-eritronolido B em eritronolido B pelo sistema do citocromo P450 mono-oxigenase de S. erythraea.

De acordo com um aspecto do processo do invento, a transformação de um microorganismo produtor de eritromicina numa estirpe produtora de 6-desoxi-eritromicina é alcançada por integração, por meio de recombinação homóloga, de um plasmídeo mutagénico numa porção do ADN do microorganismo que é responsável pela hidroxilação em C-6. Este plasmídeo de integração é construído para ser capaz de ser mantido de forma estável no microorganismo, isto é, de ser passado de uma célula transformada para a sua progénia transformada de modo semelhante. Numa concretização particular do invento, o plasmídeo de integração é construído utilizando um fragmento de ADN que é homólogo a uma porção do ADN essencial para a operação do sistema do citocromo P450 mono-oxigenase em S. erythraea.

De acordo com um aspecto adicional do processo do invento, um transformante de S. erythraea produtor de 6-desoxi-eritromicina é cruzado geneticamente com uma segunda estirpe de S. erythraea, a qual foi desenvolvida selectivamente para produzir níveis elevados de eritromicina A. De entre a progénia deste cruzamento são seleccionados microorganismos recombinantes que conservam a capacidade de produzir 6-desoxi-eritromicina, mas que alcançam rendimentos mais elevados do que aqueles possíveis com a estirpe transformante original.

Um microorganismo concretizando o presente invento é uma nova estirpe de S. erythraea, a qual produz, após cultura num meio aquoso contendo fontes assimiláveis de azoto e de carbono, um composto seleccionado de entre 6-desoxi-eritromicinas A, B, C e D, e 6-desoxi-15-noreritromicinas A, B, C e D. Mais preferivelmente, o microorganismo deste invento é aquele que foi cruzado com um produtor de eritromicina de elevado rendimento e que demonstra uma capacidade aumentada para produzir os compostos do

invento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O presente invento será mais prontamente entendido em conexão com os desenhos em anexo, nos quais:

a Figura 1 é uma via metabólica proposta para a biossíntese da eritromicina A em S. erythraea;

a Figura 2 é um fluxograma representando a construção do plasmídeo pMW56-H23 a partir do plasmídeo pMW27;

a Figura 3 é a sequência de ADN do gene eryF responsável pela hidroxilação em C-6 na S. erythraea;

a Figura 4 é a sequência de ADN de um fragmento de 503 pb utilizado como sequência de reconhecimento num plasmídeo de integração do invento;

a Figura 5 é um mapa de restrição do plasmídeo pMW56-H23;

a Figura 6 é uma representação esquemática da transformação de S. erythraea UW110 pela integração do plasmídeo pMW56-H23 contendo uma sequência de ADN homóloga;

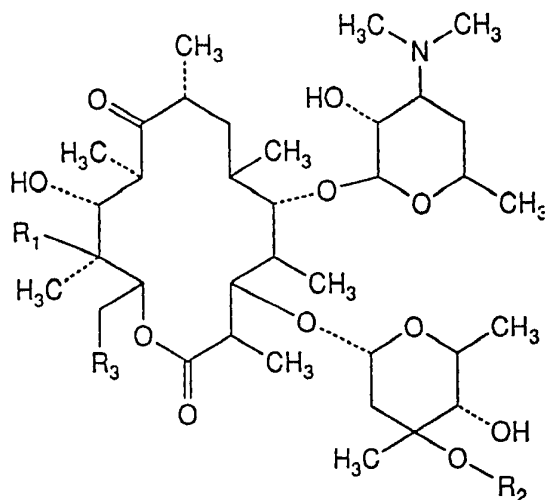
a Figura 7 é um mapa cromossômico da região genômica de S. erythraea contendo o cacho de genes biossintético da eritromicina;

as Figuras 8 e 9 são os espectros de RMN de ^1H a 500 MHz das 6-desoxi-15-noreritromicinas A e C, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento proporciona novos derivados da eritromicina e seus ésteres e sais farmacologicamente aceitáveis, bem como a utilização destes compostos como antibióticos e um processo para a sua preparação. Os compostos do invento têm fórmula es-

strutura I:



(I)

na qual R_1 é seleccionado de entre OH e H, e R_2 e R_3 são seleccionados, independentemente um do outro, de entre H e CH_3 . Os compostos de Fórmula I também aqui são designados como 6-desoxi-eritromicinas A a D e 6-desoxi-15-noreritromicinas A a D, como se segue:

	R_1	R_2	R_3
6-Desoxi-eritromicina A	OH	CH_3	CH_3
6-Desoxi-eritromicina B	H	CH_3	CH_3
6-Desoxi-eritromicina C	OH	H	CH_3
6-Desoxi-eritromicina D	H	H	CH_3
6-Desoxi-15-noreritromicina A	OH	CH_3	H
6-Desoxi-15-noreritromicina B	H	CH_3	H
6-Desoxi-15-noreritromicina C	OH	H	H
6-Desoxi-15-noreritromicina D	H	H	H

Estes compostos são obtidos por crescimento de um microorganismo produtor de eritromicina modificado geneticamente, em cultura, e, em seguida, extracção dos mesmos do meio de cultura. Numa concretização do invento aqui descrito, o microorganismo utilizado é a bactéria *Saccharopolyspora erythraea*.

O presente invento também proporciona um processo para a produção dos compostos anteriores, compreendendo a transformação de um microorganismo produtor de eritromicina do tipo selvagem ou natural, numa variante produtora dos compostos desejados. Numa concretização do invento, o transformante resultante é deficiente

no sistema do citrocromo P450 mono-oxigenase, o qual no microorganismo Saccharopolyspora do tipo selvagem é responsável pela hidroxilação do 6-desoxi-eritronolido B na posição C-6 durante a biossíntese da eritromicina. Dado que os restantes passos da via biossintética da eritromicina continuam a funcionar, são produzidos os compostos do presente invento em vez das eritromicinas A a D.

O invento também proporciona, como um exemplo, um processo particular para interrupção da hidroxilação em C-6, compreendendo a integração, por meio de recombinação homóloga, de um plasmídeo no genoma do microorganismo. O plasmídeo de integração é construído compreendendo uma sequência de nucleótidos a qual é homóloga com uma porção do genoma do microorganismo. Numa concretização do invento, a homologia é com uma subsérie do gene a qual, no microorganismo do tipo selvagem, é responsável pela hidroxilação na posição C-6. A integração do plasmídeo no local de homologia separa o gene em duas sequências incompletas, nenhuma das quais é suficiente para a hidroxilação em C-6. A hidroxilação é, conseqüentemente, interrompida desde que o plasmídeo de integração seja mantido de forma estável dentro do genoma do microorganismo.

Dado que não é provável que um microorganismo do tipo selvagem produza rendimentos elevados de eritromicina, é improvável, de modo semelhante que os transformantes do referido organismo produzam quantidades comercialmente úteis de 6-desoxi-eritromicina. Assim, o presente invento ainda proporciona a utilização de estirpes de elevada produção para aumentar os rendimentos obtidos por fermentação das estirpes produtoras de 6-desoxi-eritromicina. As referidas variantes de elevada produção, as quais estão disponíveis comercialmente ou podem ser obtidas por criação selectiva de microorganismos do tipo selvagem, podem, por exemplo, ser cruzadas com transformantes produtores de 6-desoxi-eritromicina ou, alternativamente, serem elas próprias transformadas em produtores de 6-desoxi-eritromicina de nível elevado.

Numa concretização preferida do processo do invento, um transformante de um microorganismo Saccharopolyspora do tipo

selvagem é cruzado geneticamente com um produtor de nível elevado de eritromicina. A progenia recombinante deste cruzamento é selecionada quanto à retenção da capacidade de produzir 6-desoxi-eritromicina bem como quanto à capacidade para produzir níveis elevados dos compostos desejados.

O transformante do tipo selvagem e a progenia recombinante são representativos dos microorganismos do presente invento, os quais incluem quaisquer produtores de eritromicina que foram modificados geneticamente para produzir 6-desoxi-eritromicina. Uma concretização preferida dos microorganismos do invento, preparados de acordo com os Exemplos abaixo, é Saccharopolyspora erythraea 41R. Esta estirpe cruzada, a qual produz quantidades significativamente mais elevadas de 6-desoxi-eritromicina do que o seu progenitor transformante, foi depositada sob os termos do tratado de Budapeste na Agricultural Research Culture Collection, Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, United States, e foi-lhe conferido o número de acesso NRRL 18643.

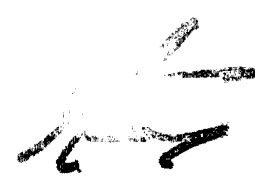
Os processos do presente invento são amplamente aplicáveis a todos os microorganismos produtores de eritromicina, dos quais uma lista não exaustiva inclui Saccharopolyspora species, Streptomyces griseoplanus, Nocardia sp., Micromonospora sp., Arthrobacter sp. e Streptomyces antibioticus. Destes, o mais preferido é Saccharopolyspora erythraea. Acredita-se que na biossíntese da eritromicina por S. erythraea, o composto é produzido de acordo com a via apresentada na Figura 1, na qual os passos (1) e (2) são a construção da macrolactona de 14 membros, 6-desoxi-eritronolido B a partir dos tioésteres de propionilo e de 2-metilmalonilo, seguida pela sua hidroxilação em eritronolido B; os passos (3) e (4) são a formação dos desoxi-açúcares micarose e desosamina a partir da glucose e a sua adição ao eritronolido B para formar a eritromicina D; e os passos (5) e (6) [ou (6") e (5")] são a hidroxilação em C-12 e a O-metilação em C-3" para produzir a eritromicina A.

O intermediário mais precoce identificado na biossíntese da

eritromicina por S. erythraea é o 6-desoxi-eritronolido B, o qual é hidroxilado como o passo seguinte na via biossintética. Esta hidroxilação é catalisada por um sistema do citocromo P450 mono-oxigenase que necessita de duas flavoproteínas e de uma proteína com ferro e enxofre (eritroxina), a qual actua em conjunto com a 6-hidroxilase (Shafiee e colb., J. Bacteriol. 170:1548-1553 (1988)).

A interrupção deste passo de hidroxilação em C-6 durante a biossíntese da eritromicina origina a formação de 6-desoxi-eritromicina A, bem como de outros intermediários 6-desoxi da via biossintética. Uma forma de interrupção da hidroxilação é através da rutura de um gene celular necessário para a operação do sistema do citocromo P450 mono-oxigenase. Isto pode ser alcançado por inserção no referido gene de um plasmídeo de integração, o qual é mantido no microorganismo de forma estável, transformando deste modo, o microorganismo num mutante produtor de 6-desoxi-eritromicina. Pode ser utilizado qualquer plasmídeo que possa ser integrado no genoma do microorganismo e que origine a interrupção da hidroxilação do 6-desoxi-eritronolido. Contudo, o processo do invento não está de forma alguma limitado à utilização da ruptura do gene para produzir mutantes deficientes na hidroxilação do 6-desoxi-eritronolido. Também podem ser utilizados outros processos que rompem o sistema da hidroxilase, tais como a substituição do gene (que envolve a remoção de sequências específicas do gene) ou a mutagénese induzida pela luz ou quimicamente, para produzir o microorganismo geneticamente modificado desejado.

Embora sejam conhecidos na arte diversos processos para inserção do ADN estranho num plasmídeo para formar um plasmídeo integrativo, o processo preferido de acordo com este invento encontra-se representado esquematicamente na Figura 2 e demonstrado nos Exemplos abaixo. Numa concretização preferida do presente invento, é construído uma plasmídeo de ADN seleccionável, o qual compreende (a) um fragmento do plasmídeo pIJ702 contendo uma determinante para a replicação e um fragmento de ADN conferindo resistência ao antibiótico tioestreptona (tsr), cada um dos quais é funcional em Streptomyces; (b) uma origem de replicação funcional

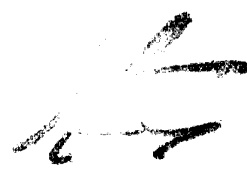


e um fragmento de ADN conferindo resistência ao antibiótico ampicilina (amp), cada um dos quais é funcional em *E. coli*; e (c) um fragmento de ADN da região ermE de *S. erythraea*, contendo uma porção de um gene responsável pela operação do sistema do citocromo P450 mono-oxigenase e capaz de actuar como uma sequência de reconhecimento para a integração do plasmídeo. Uma cultura de *E. coli* que contém um plasmídeo concretizando o invento, designado por pMW56-H23, foi depositada como anteriormente na Agricultural Research Culture Collection e foi-lhe conferido o número de acesso NRRL B-18628.

Os genes da resistência a antibióticos particulares e as origens de replicação funcionais são apenas necessários visto que permitem a selecção e replicação dos plasmídeos recombinantes desejados. Na prática do invento podem ser utilizados outros marcadores e origens de replicação, sempre que exequível. Da mesma maneira, pode ser utilizada qualquer sequência de reconhecimento que permita que o plasmídeo recombinante seja integrado numa porção do genoma do microorganismo necessária para a hidroxilação em C-6 e que resulte na interrupção da hidroxilação. No organismo preferido *S. erythraea*, a sequência de reconhecimento pode ser um fragmento compreendendo uma subsérie da sequência de nucleótidos representada na Figura 3, a qual se acredita representar o gene *eryF* que codifica a C-6 hidroxilase e as sequências flanqueadoras adjacentes.

Uma sequência de reconhecimento operativa, utilizada nos Exemplos abaixo, está representada na Figura 4. Este fragmento Sau3A-Sau3A de 503 pb é obtido a partir do fragmento Hind III-EcoRI de 10 Kb do cosmídeo pJ1 de acordo com o processo dos Exemplos.

Podem-se identificar outras sequências as quais estão localizadas noutros lugares no genoma de *S. erythraea*; também estas são consideradas como estando dentro do âmbito do presente invento. Além disso, naqueles casos em que foi sequenciada uma porção do genoma do microorganismo responsável pela hidroxilação em C-6, o plasmídeo do invento pode ser construído sem a utilização de um



digerido genómico parcial como no exemplo anterior. Em vez disso, uma sequência de reconhecimento pode ser sintetizada de novo e ligada aos fragmentos de origem e de resistência necessários para formar um plasmideo de integração.

Os plasmídeos de integração do presente invento podem ser utilizados em conjunção com S. erythraea ou outras estirpes hospedeiras. Os plasmídeos são úteis porque são pequenos, versáteis e podem ser introduzidos numa diversidade de estirpes hospedeiras, incluindo S. erythraea e E. coli.

Uma concretização dos plasmídeos de integração deste invento está representada no mapa de restrição da Figura 5. Designado aqui como pMW56-H23, o plasmideo contém o fragmento Sau3A-Sau3A da Figura 4, inserido num novo plasmideo formado pela combinação dos plasmídeos pUC18 e pIJ702. A sequência Sau3A é inserida num local BglII único representado na Figura 5 no fundo do plasmideo.

A integração dum plasmideo representativo do presente invento num microorganismo hospedeiro produtor de eritromicina está ilustrada esquematicamente na Figura 6. A sequência de reconhecimento (sombreada) é homóloga com uma subsérie do gene hospedeiro para o enzima C-6-hidroxilase. A recombinação por entrecruzamento ("crossing-over") entre as sequências homólogas origina a integração estável do plasmideo e é acompanhada pela perda da 6-hidroxilação durante a biossíntese da eritromicina.

O presente invento é suficientemente versátil para que qualquer sequência de nucleótidos que seja capaz de ser integrada no genoma de S. erythraea por meio de recombinação homóloga, de modo a produzir um transformante que seja deficiente no sistema do citocromo P450 mono-oxigenase possa ser substituída pela sequência de nucleótidos exemplificada acima. Deverá compreender-se que a sequência de ADN inserida como uma sequência de reconhecimento no local de restrição seleccionado do plasmideo de integração pode incluir nucleótidos que não façam parte dos genes estruturais efectivos para o sistema do citocromo P450 mono-oxigenase ou pode apenas incluir um fragmento desses genes estrutu-

rais. Quaisquer genes reguladores que controlem a biossíntese da eritromicina podem, do mesmo modo, ser interrompidos através da utilização de um plasmídeo de integração ou doutra técnica mutagénica, sem haver afastamento do âmbito do invento.

O presente invento proporciona ainda composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto do invento em combinação com um transportador farmacêutico. Por administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz das composições do invento, elas podem ser utilizadas para o tratamento e prevenção de infecções bacterianas ou outras em humanos e em outros doentes mamíferos.

Os compostos do presente invento incluem ésteres e sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos de Fórmula I, os quais podem ser preparados utilizando técnicas preparativas convencionais. Os sais do invento incluem aqueles formados pela reacção com ácidos orgânicos, tais como um ácido carboxílico orgânico (como os ácidos tartárico, cítrico, estearico ou succínico) ácido metanossulfónico, ácido amino-etanossulfónico, um aminoácido (como o ácido aspártico ou o ácido glutâmico), ou similares. Estes sais podem ser obtidos por tratamento de um composto de Fórmula I com o ácido correspondente. Os compostos anteriores são úteis para o tratamento e prevenção da infecção patogénica em doentes humanos e animais, da mesma maneira como as eritromicinas foram anteriormente empregues.

Os compostos do invento também incluem o intermediário biossintético 3- α -mucarosil-6-desoxi-eritronolido B o qual, tal como aqueles descritos anteriormente, pode servir como um reagente na síntese de mais macrólidos com interesse.

As composições do presente invento são preparadas por formulação de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto do invento em conjunto com um transportador farmacêuticamente eficaz para injeção parentérica, administração oral na forma sólida ou líquida, administração rectal, e similares. "Quantidade terapêuticamente eficaz" significa uma quantidade do composto suficiente

para tratar ou prevenir uma infecção bacteriana ou por outro microorganismo com uma razão risco/benefício razoável. As doses diárias totais administradas a um doente em doses únicas ou divididas podem ser em quantidades, por exemplo, de 1 a 100 mg/kg e, mais geralmente, de 5 a 50 mg/kg. A composição de dosagem unitária pode conter submúltiplos da mesma para completar a dose diária desejada.

A quantidade de ingrediente activo que pode ser combinada com os materiais transportadores para produzir uma forma de dosagem unitária única variará, dependendo do doente tratado e do modo de administração particular. Além disso, deverá compreender-se que a quantidade eficaz de um composto deste invento variará com o organismo particular a ser tratado ou prevenido; com a gravidade da infecção; com a duração do tratamento; com o composto específico, éster ou sal, a ser empregue; com a idade e o peso do doente; e com factores semelhantes bem conhecidos na arte médica.

As composições para administração parentérica podem incluir soluções, suspensões ou emulsões estéreis, aquosas ou não aquosas, farmacologicamente aceitáveis. Exemplos de transportadores, diluentes, solventes ou veículos não aquosos adequados incluem propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis, como oleato de etilo. As referidas composições também podem conter adjuvantes tais como agentes conservantes, molhantes, emulsionantes e dispersantes. Podem ser esterilizadas, por exemplo, por filtração através dum filtro de retenção de bactérias, ou por incorporação de agentes esterilizadores nas composições. Também podem ser produzidos sob a forma de composições sólidas estéreis as quais podem ser dissolvidas em água estéril, ou em qualquer outro meio injectável estéril, imediatamente antes da utilização.

As formas de dosagem sólidas para administração oral incluem cápsulas, comprimidos, pilulas, pós, e grânulos. Nas referidas formas de dosagem sólidas, o composto activo pode ser misturado com pelo menos um diluente inerte, tal como sacarose, lactose ou

amido. As referidas formas de dosagem também podem incluir, tal como é prática habitual, substâncias adjuvantes farmacêuticas, tais como agentes lubrificantes de estearato. No caso das cápsulas, comprimidos e pilulas, as formas de dosagem também podem incluir agentes tamponantes. As preparações orais sólidas também podem ser preparadas com revestimentos entéricos ou outros, os quais modulam a libertação dos ingredientes activos.

As formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmacêuticamente aceitáveis contendo diluentes inertes não tóxicos habitualmente utilizados na arte, tais como água e álcool. As referidas composições também podem incluir adjuvantes, tais como agentes molhantes, emulsionantes, de suspensão, edulcorantes, saborizantes e perfumantes.

O termo "sistema do citocromo P450 mono-oxigenase", tal como aqui utilizado, refere-se a um grupo de proteínas (duas flavoproteínas, uma proteína com ferro e enxofre (eritrodoxina) e o enzima C-6-hidroxilase), as quais actuam em conjunto para produzir a hidroxilação do 6-desoxi-eritronolido B em S. erythraea.

O termo "plasmídeo", tal como aqui utilizado, refere-se a uma pequena forma circular de ADN que transporta certos genes ou porções de genes e que é capaz de se replicar independentemente num microorganismo hospedeiro.

O termo "cacho do gene biossintético da eritromicina", tal como aqui utilizado, refere-se a genes envolvidos na biossíntese da eritromicina A localizados na vizinhança do gene que confere a resistência à eritromicina.

O termo "entrecruzamento" ("crossing-over"), tal como aqui utilizado, refere-se a um mecanismo para a permuta de genes entre um cromossoma do microorganismo e ADN homólogo contido num plasmídeo, através dum processo envolvendo a quebra e reunião de segmentos de ADN.

O termo "recombinação homóloga", tal como aqui utilizado, refere-se a emparelhamento de bases complementares e entrecruzamento entre cadeias de ADN contendo sequências idênticas ou quase idênticas.

O termo "origem de replicação de E. coli", tal como aqui utilizado, refere-se a uma sequência de ADN que controla e permite a replicação e manutenção de um plasmídeo ou de outro vector em E. coli.

O termo "origem de replicação de Streptomyces", tal como aqui utilizado, refere-se a uma sequência de ADN que controla e permite a replicação e manutenção de um plasmídeo ou outro vector em Streptomyces.

O termo "fragmento de restrição", tal como aqui utilizado, refere-se a qualquer ADN linear produzido pela acção de um ou mais enzimas de restrição.

O termo "transformação" tal como aqui utilizado refere-se à introdução de ADN num microorganismo receptor que altera o genótipo e, conseqüentemente, origina uma alteração no microorganismo.

Estirpes bacterianas, vectores plasmídicos e meios de crescimento

Os microorganismos produtores de eritromicina utilizados para pôr em prática os exemplos seguintes do invento eram derivados de S. erythraea de tipo selvagem, anteriormente Streptomyces erythreus NRRL 2338 (UW22, Weber e colb., J. Bacteriol. 164:425-433 (1985)). A estirpe hospedeira na qual foi levada a cabo a transformação integrativa foi S. erythraea UW110 (met-4 leu-18 rif-63). A estirpe hospedeira na qual os derivados de pIJ702 foram replicados era Streptomyces lividans TK21, a qual foi obtida de John Innes Institute, Norwich, UK. A estirpe hospedeira para o crescimento dos plasmídeos derivados de Escherichia coli foi E. coli DH5- α de Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg, Maryland.

O plasmídeo pIJ702 (Katz e colb., J. Microbiol. 129: 2703-2714 (1983)) foi obtido de John Innes Institute. O plasmídeo pUC18 foi obtido de BRL. O cosmídeo pJ1, o qual inclui o ADN de S. erythraea de tipo selvagem contendo o gene ermE, foi fornecido por L. Katz, J. Tuan e M. Staver de Abbott Laboratories. O plasmídeo pMW27, um vector multifuncional progenitor para a transformação integrativa em S. erythraea, foi construído a partir de pIJ702 e pUC18 reunidos nos seus locais KpnI únicos na orientação com o local EcoRI de pUC18 mais próximo do local BglII do pIJ702.

S. erythraea foi cultivada em cultura líquida em 50 ml de Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 2% de glicina, em balões de agitação de 500 ml a 32°C. Foram utilizadas placas de ágar R2T2 (Weber e colab., 1988) para regeneração de micélios a partir de protoplastos ou como um meio geral de esporulação. Os transformantes de S. erythraea foram seleccionados utilizando tioestreptona a 5 µg/ml (cultura líquida) ou a 10 µg/ml (cultura sólida).

Reagentes e Processos Gerais

Utilizaram-se reagentes disponíveis comercialmente para preparar os compostos, plasmídeos e variantes genéticas do presente invento, incluindo ampicilina, endonucleases de restrição, T4-DNA-ligase e fosfatase alcalina intestinal de vitelo. Os enzimas de restrição e a T4-DNA-ligase foram utilizados de acordo com as instruções do fornecedor no que diz respeito às condições de reacção. A tioestreptona foi obtida de E. R. Squibb and Sons, Princeton, New Jersey.

Durante a preparação do plasmídeo de integração, foram utilizados processos padrão para o crescimento e transformação do hospedeiro intermediário E. coli (Maniatis e colab., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)). A transformação final de S. erythraea foi efectuada por uma variação do processo de Weber e colab., (Gene 68:173-180 (1988)), tal como detalhado abaixo.

O precedente pode ser melhor compreendido por referência aos exemplos seguintes, os quais são fornecidos como ilustrações não limitativas da prática do invento.

EXEMPLO 1

Construção do Plasmídeo pMW27

O plasmídeo pMW27 foi construído utilizando processos padrão da tecnologia de ADN recombinante de acordo com o esboço esquemático representado na Figura 2. O plasmídeo pUC18 de *E. coli* (Yanisch-Perron e colab., Gene, 33:103-119 (1985)) foi completamente digerido com a endonuclease de restrição KpnI. O fragmento KpnI resultante foi ligado ao plasmídeo pIJ702, que também tinha sido clivado com KpnI (Katz e colab., J. Gen. Microbiol. 129: 2703-2714 (1983)). Os produtos da ligação foram utilizados para transformar *E. coli* DH5- α (Bethesda Research Labs., Gaithersberg, MD), a qual foi cultivada em presença de ampicilina a fim de seleccionar as células hospedeiras portadoras de um plasmídeo recombinante. O ADN plasmídico foi isolado a partir de transformantes individuais e caracterizado em relação a locais de restrição marcadores, confirmando a formação do plasmídeo recombinante pMW27 de 8,5 kb.

EXEMPLO 2

Isolamento de Fragmento da região ermE de *S. erythraea*

Uma porção do genoma de *S. erythraea* responsável pela operação do sistema do citocromo P450 mono-oxigenase foi isolada utilizando exploração da ruptura de gene a qual é modelada segundo a clonagem mutacional descrita por Chater e colab., Gene, 26:67-78 (1983). Esta técnica foi utilizada para sondar a região contendo ermE do cromossoma de *S. erythraea*.

Tal como é o caso de outros organismos produtores de antibióticos, pensou-se que os genes para a biossíntese da eritromicina se encontravam agrupados em cachos em torno do gene da resistência à eritromicina, ermE. Para confirmar esta opinião e

para isolar as sequências de nucleótidos responsáveis pela hidroxilação em C-6, fragmentos de ADN clonados do cromossoma de S. erythraea que cobrem a região com interesse foram digeridos parcialmente utilizando as endonucleases de restrição EcoRI e HindIII. Os fragmentos de ADN resultantes foram separados por electroforese em gel, purificados a partir do gel de agarose por GeneClean (Bio 101, La Jolla, CA) e parcialmente digeridos com o enzima Sau3A. Foram produzidos fragmentos de ADN na gama de tamanhos de 0,2 a 1,0 kb e foram novamente separados por electroforese em gel, purificados com GeneClean e ligados ao pMW27, o qual tinha sido digerido com BglIII. A ligação foi facilitada por pré-tratamento do digerido de pMW27 com fosfatase alcalina intestinal de vitelo.

Os plasmídeos recombinantes ligados foram então utilizados para transformar as células DH5- α de E. coli, as quais foram então cultivadas em ágar LB suplementado com ampicilina (100 μ g/ml) e X-gal (5'-bromo-4'-cloro-3'-indolil-B-D-galactósido) para seleccionar os transformantes portadores de plasmídeos com inserções. Estes transformantes foram identificados por hibridação de mancha de colónia (Maniatis e colab., 1982) utilizando, como sondas, fragmentos radiomarcados da sequência de ADN EcoRI-HindIII original. Os plasmídeos com inserções foram, em seguida, transformados integrativamente em protoplastos de S. erythraea UW110. Os transformantes primários de S. erythraea foram seleccionados com 10 mg/ml de tioestreptona em placas R2T2 e os esporos foram recolhidos e combinados em glicerol. Os transformantes integrados foram isolados quer (a) colocação em placa de uma porção dos esporos combinados de transformantes primários em R2T2, recolha do campos de esporos e recolocação em placas das colónias simples em R2T2 com tioestreptona; quer por (b) passagem dos esporos combinados de transformantes primários através de duas a três purificações de colónia simples em R2T2 com tioestreptona.

Para determinar a localização da inserção do plasmídeo, foi preparado ADN cromossómico a partir de estirpes transformadas integrativamente e da estirpe progenitora. Os ADN foram comparados por análise de Southern sondando com o fragmento de ADN que cobre

a região na qual as inserções tinham sido feitas. A integração por recombinação homóloga foi identificada pelo desaparecimento de uma banda no ADN progenitor e o aparecimento de duas novas bandas de junção no ADN transformante.

A biblioteca resultante consistia em aproximadamente 350 clones, que se mostrou, através das anteriores análises de mancha de Southern e de restrição, conterem fragmentos com tamanho de 0,4 a 1,0 kb. Verificou-se que os fragmentos eram homólogos com uma região de 10 kb do cromossoma de *S. erythraea*, representada no mapa cromossômico da Figura 7 e situando-se entre os genes *eryCI* e *eryCII*. Verificou-se que o gene responsável pela hidroxilação em C-6, posteriormente designado *eryF*, se posicionava entre os genes *eryH* e *eryG*.

EXEMPLO 3

Construção do Plasmídeo pMW56-H23

Um plasmídeo de integração concretizando o invento foi preparado a partir do plasmídeo pMW27 de acordo com o esboço esquemático da Figura 2. O cosmídeo pJ1, o qual continha a região do gene *ermE* de *S. erythraea* e aproximadamente 30 kb de ADN flanking, foi digerido completamente com os enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Dos produtos de digestão, foi isolado um fragmento de ADN de 10 kb, o qual foi identificado como compreendendo a região desde o local HindIII de *ermE* e sequências a jusante de *ermE*, até ao primeiro local EcoRI para além do gene *eryG* (Weber e colab., 1989) (ver Fig. 5). Utilizando condições padrão (Maniatis e colab., 1982), o fragmento de ADN de 10 kb foi submetido a digestão parcial com Sau3A. Os fragmentos de ADN de 0,4 a 1,0 kb foram separados utilizando um gel de agarose preparativo e isolados com GeneClean (Bio101, LaJolla, CA). Os fragmentos de ADN foram ligados ao pMW27, o qual tinha sido clivado com o enzima de restrição BglII e tratado com fosfatase alcalina (de intestino de vitelo).

Foi seleccionado um plasmídeo, designado pMW56-H23, para análise adicional baseada na sua capacidade de originar transfor-

mantas produzindo um composto com interesse tal como identificado por cromatografia de camada fina (TLC). Verificou-se que o plasmideo pMW56-H23 continha um fragmento de ADN de 503 pb com origem na região *eryF* do cromossoma de *S. erythraea* e representado na Figura 4 dos desenhos em anexo. A análise adicional do plasmideo pMW56-H23 permitiu a construção do local de restrição e do mapa funcional do plasmideo pMW56-H23, o qual está representado na Figura 5.

EXEMPLO 4

Construção de *Saccharopolyspora erythraea* UW110::pMW56-H23

Um exemplo do microorganismo produtor de 6-desoxi-eritromicina do presente invento foi preparado por transformação de células de *S. erythraea* com o plasmideo recombinante do Exemplo anterior. A transformação foi rebaizada utilizando protoplastos de *S. erythraea* de acordo com o processo seguinte. Sob condições estéreis e um volume de cultura de 50 ml, foram cultivadas três culturas de *Saccharopolyspora erythraea* UW110 (Weber e colab., *J. Bacteriol.* 164:425-433 (1985)), com agitação, em Tryptic Soy Broth (TSB; Sigma, St Louis, MO) com 2% de glicina, a 32°C, durante 3, 4 e 5 dias, respectivamente, e, em seguida, lavadas separadamente em 25 ml de sacarose a 10,3%. As células lavadas foram então suspensas em 25 ml de tampão PT contendo 2-5 mg/ml de lisozima, após o que as suspensões foram combinadas e incubadas a 30°C durante 30-60 minutos até que a maioria dos fragmentos micelóides tivessem sido convertidos em protoplastos esféricos. (tampão PT por 1 litro de solução aquosa: 100 g de sacarose, 5,08 g de MgCl₂.6H₂O, 0,25 g de K₂SO₄, 2 ml de elementos vestigiais (Hopwood e colab., *Methods Manual*, 1985), e água destilada até 875 ml, com a adição, após esterilização e na altura da utilização, de 25 ml de CaCl₂.2H₂O 1M e 100 ml de TES 0,25M (pH 7,2).)

Os protoplastos foram lavados uma vez e suspensos em 10 ml de tampão PT. Os protoplastos de 1 ml da suspensão foram recolhidos sob centrifugação suave (1 000 x g durante 15 minutos) e ressuspensos suavemente no líquido restante após decantação do

sobrenadante de PT. A transformação foi realizada por adição de cerca de 5 μ l (5 μ g) do plasmídeo pMW56-H23 e 0,5 ml de PEG a 25% (polietilenoglicol, PM 3350, Sigma, St. Louis, MO) à suspensão dos protoplastos. Os protoplastos foram lavados e ressuspensos em 0,5-1,0 ml de tampão PT. Volumes de 200 μ l dos protoplastos transformados foram colocados em placas sobre 25 ml de ágar de regeneração R2T2 (Weber e colab., 1989). As placas foram incubadas durante toda a noite a 32°C, de seguida foram revestidas com 2,5 ml de ágar nutriente mole (bacto-ágar a 0,3%, caldo nutriente de difco a 0,8%) contendo 100 μ g/ml de tioestreptona e re-incubadas a 32°C até os transformantes aparecerem e esporularem. A fim de isolar uma estirpe transformante integrada pura, foram recolhidos os esporos dos transformantes primários, e foram cultivados em cultura em linha ("streaked") duas vezes para pesquisa de colónias simples em ágar R2T2 contendo 10 μ g/ml de tioestreptona. As colónias resultantes foram cultivadas da forma convencional e constituíam os transformantes de S. erythraea UW110::pMW56-H23 desejados.

EXEMPLO 5

Construção de Saccharopolyspora erythraea 41R

Um exemplo preferido do microorganismo produtor de 6-desoxi-eritromicina do presente invento foi preparado por condução de um cruzamento genético entre o transformante anterior de S. erythraea UW110::pMW56-H23 e outra estirpe conhecida por produzir níveis elevados de eritromicina A. O cruzamento foi executado como se segue: suspensões de esporos de cada uma das duas estirpes progenitoras (10^8 esporos/ml em glicerol a 20%) foram misturadas em proporções iguais, e porções de 0,1 ml da mistura foram colocadas em placas sobre meio de ágar E20A. (meio E20A por 1 litro de solução aquosa: 5 g de bacto-soytone, 5 g de amido solúvel, 3 g de CaCO₃, 2,1 g de MOPS, e 20 g de ágar). As placas foram incubadas a 32°C até que a esporulação ocorresse (5-7 dias). Os esporos resultantes foram recolhidos, suspensos em glicerol a 20% a 10^8 esporos/ml, e colocados em placas para pesquisa de recombinantes sobre meio AVMM contendo 10 μ g/ml de tioestreptona (meio AVMM por 1 litro de solução aquosa: 1 g de

K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $MgSO_4$, 10 mg de $FeSO_4$, e 5 g de asparagina, aos quais foram adicionados, após esterilização, 20 ml de glucose a 50%, 0,5 mg, de cada um, de tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, ácido nicotínico e piridoxina, e 0,05 mg, de cada um, de ácido fólico, biotina e vitamina B-12).

A progénia produzindo 6-desoxi-eritromicinas foi seleccionada graças à sua capacidade de crescer em meio AVMM em presença de tioestreptona. Isolou-se um certo número de recombinantes examinaram-se, por TLC, quanto a níveis elevados de produção de 6-desoxi-eritromicinas. Verificou-se que um isolado, designado 41R, produzia os compostos do invento em níveis significativamente mais elevados do que aqueles obtidos a partir do transformante progenitor.

EXEMPLO 6

Fermentação de *Saccharopolyspora erythraea* 41R

A *S. erythraea* 41R recombinante produzida no Exemplo anterior, foi cultivada em maiores quantidades utilizando o processo de fermentação seguinte. Esporos de *S. erythraea* 41R foram retirados das placas do meio de ágar E20A do organismo e adicionados a 50 ml de meio E29F num balão de Erlenmeyer com agitação de 500 ml (meio E29F por 1 litro de solução aquosa: 22 g de farinha de soja, 15 g de amido de milho, 3 g de $CaCO_3$, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 50 ml de óleo de soja). A cultura de primeiro estágio foi então incubada, sob agitação, durante 48 horas a 32°C. Após a incubação, foram utilizadas porções de 1 ml da cultura de primeiro estágio para inocular 50 balões de fermentação de segundo estágio, contendo também meio E29F. Estas culturas foram então incubadas, sob agitação, durante 5 dias a 32°C.

Ao quinto dia, as culturas foram combinadas e as células separadas do caldo de cultura por centrifugação. O caldo de cultura foi ajustado até pH 10 com uma solução de NaOH 4N e tratado com um volume igual de acetato de etilo para extrair os compostos do presente invento.

EXEMPLO 7Isolamento dos Compostos

Os diversos compostos do presente invento foram isolados utilizando o processo seguinte. O extracto de acetato de etilo de 1150 ml do caldo de fermentação completo, preparado tal como descrito no Exemplo anterior, foi ajustado até pH 9 e concentrado até um óleo. O concentrado foi submetido a partição entre 150 ml de cada um de heptano e metanol, e a camada inferior de metanol foi concentrada até 1,74 g de resíduo. O resíduo foi submetido a cromatografia numa coluna Sephadex LH-20 (3,2 cm x 75 cm), a qual foi pré-intumescida com uma mistura de clorofórmio, heptano e etanol (10:10:1, v/v/v), e carregada e eluída com o mesmo solvente. Fracções de dez mililitros foram recolhidas e analisadas por TLC em placas de sílica-gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄) e reveladas com um sistema solvente de éter isopropílico, metanol e hidróxido de amónio concentrado (150:70:4, v/v/v). Os pontos foram visualizados nas placas secas por aquecimento da placa após pulverização com anisaldeído a 5% em etanol: ácido sulfúrico (19:1, v/v). As fracções números 30-32 apresentavam um ponto magenta possuindo um Rf semelhante ao da eritromicina A, cujo Rf varia de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,6. Estas fracções foram combinadas e concentradas até um resíduo, daqui em diante designado por resíduo A (38 mg). As fracções subsequentes numeros 33-38 foram concentradas até um resíduo, daqui em diante designado por resíduo B (77,5 mg).

O resíduo A foi submetido a cromatografia, em duas porções, numa centrifuga Ito Coil Planet Centrifuge, num sistema solvente constituído por tetracloreto de carbono, metanol e tampão de fosfato de potássio aquoso 0,01M, pH 7,0 (1:1:1), sob as condições seguintes: fase superior móvel; cauda como entrada; caudal de aproximadamente 3 ml/min a 800 rpm; e retenção de fase estacionária de aproximadamente 60% . Foram recolhidas fracções de 10 ml. O aparecimento da fase móvel ocorreu na fracção 12. As fracções foram analisadas quanto à bioactividade com um ensaio de difusão em disco de ágar em placas de pH 8 semeadas com Staphylo-

coccus aureus 6538P e por TLC como anteriormente. As fracções semelhantes foram combinadas, concentradas e submetidas a partição entre diclorometano e hidróxido de amónio diluído (pH 9). As camadas de diclorometano foram concentradas até resíduos sólidos. As fracções números 32 a 42 produziram um total de 9 mg de um sólido branco posteriormente identificado como 6-desoxi-eritromicina C. As fracções 100 a 135 produziram um total de 13,4 mg de um sólido branco, posteriormente identificado como 6-desoxi-eritromicina A.

O resíduo B foi submetido a cromatografia, sob condições idênticas, numa centrifuga Ito Coil Planet Centrifuge. As fracções números 10-15 produziram 1,8 mg de 6-desoxi-15-noreritromicina C (possuindo o espectro de RMP representado na Figura 9), enquanto que as fracções 32-40 produziram 4,2 mg de 6-desoxi-eritromicina C, e as fracções 125-135 produziram 10,1 mg de 6-desoxi-eritromicina A.

EXEMPLO 8

Isolamento de Compostos Adicionais

Novas culturas de S. erythraea 41R foram cultivadas de acordo com as técnicas do Exemplo 6, com a excepção de ter sido empregue uma forma 1,25 vezes mais concentrada do meio E29F, utilizando 40 ml em vez de 50 ml por balão. Após o crescimento, as culturas foram combinadas e extractadas com acetato de etilo. A fracção de acetato de etilo foi concentrada até um resíduo (3,71 g), e o resíduo foi submetido a cromatografia numa coluna Sephadex LH-20 (65 x 5 cm), carregada e eluída com n-heptano, clorofórmio e etanol (10:10:1, v/v/v). As fracções foram analisadas tal como descrito no Exemplo 7. As fracções precoces foram combinadas para originarem 220 mg de um resíduo vítreo branco, daqui em diante designado por resíduo C. As fracções tardias foram combinadas para originar um segundo resíduo vítreo branco, daqui em diante designado por resíduo D.

O resíduo C foi submetido a cromatografia numa centrifuga Ito Coil Planet Centrifuge num sistema solvente de tetracloreto

de carbono, metanol e tampão de fosfato de potássio aquoso 0,01M, pH 7,0 (1:1:1, v/v/v), utilizando as condições seguintes: fase inferior móvel; cauda como entrada; caudal de aproximadamente 5 ml/min a 800 rpm; foram recolhidas fracções de 10 ml. O deslocamento da fase superior a partir de uma coluna de aproximadamente 325 ml foi de cerca de 50 ml. Foram analisadas fracções de aproximadamente 10 ml cada por TLC, e combinadas adequadamente. A fracção Nº 6 foi concentrada e produziu 6-desoxi-eritromicina B (20,4 mg). As fracções números 8 e 9 foram combinadas e concentradas até produzirem 6-desoxi-15-noreritromicina B (21,4 mg).

O resíduo D foi submetido a cromatografia numa coluna Sephadex LH-20 em metanol. As fracções foram recolhidas e analisadas por TLC. As fracções iniciais foram combinadas para produzirem um resíduo brilhante, o qual foi submetido a cromatografia numa centrífuga Ito Coil Planet Centrifuge num sistema solvente de tetracloreto de carbono, metanol e tampão de fosfato de potássio aquoso 0,05M, pH 6,0 (1:1:1, v/v/v) com a fase inferior móvel no modo cauda para cabeça. Foram recolhidas fracções de aproximadamente 10 ml. As fracções foram analisadas por TLC e combinadas adequadamente. As fracções 46-58 foram combinadas e concentradas para produzir 6-desoxi-eritromicina D (26,2 mg).

EXEMPLO 9

Isolamento de Compostos Adicionais

Utilizando as técnicas dos Exemplos precedentes, foi usado acetato de etilo para extractar aproximadamente 1200 ml de caldo de fermentação completo duma cultura de um recombinante cruzado produtor em níveis elevados do invento. A fracção de acetato de etilo foi concentrada até um resíduo oleoso, o qual foi submetido a partição entre 200 ml de n-heptano e 200 ml de metanol. A camada metanólica foi concentrada até um resíduo oleoso (3,98 g). Uma porção de 2,0 g deste resíduo foi submetida a cromatografia numa coluna Sephadex LH-20, a qual foi pré-intumescida com uma mistura de clorofórmio, heptano e etanol (10:10:1, v/v/v), e carregada e eluída com o mesmo solvente. Foram recolhidas e analisadas fracções (de aproximadamente 10 ml cada), tal como no

Exemplo 7. As fracções 70-160 produziram 350 mg de um sólido vítreo branco, daqui em diante designado por resíduo E.

O resíduo E foi submetido a cromatografia numa centrífuga Ito Coil Planet Centrifuge num sistema solvente constituído por tetracloreto de carbono, metanol e tampão de fosfato de potássio aquoso 0,01M, pH 7,0 (1:1:1, v/v/v), sob as condições seguintes: fase superior móvel; cauda como entrada; 800 rpm; caudal de aproximadamente 3 ml/min; retenção estacionária de aproximadamente 80%. Foram recolhidas fracções de 10 ml. As fracções foram analisadas por TLC como descrito no Exemplo 7, e combinadas adequadamente. As fracções combinadas foram ajustadas até pH 9, com hidróxido de amónio aquoso concentrado e extractadas duas vezes com volumes iguais de diclorometano. Os extractos de diclorometano foram lavados uma vez com água e, em seguida, concentrados para produzir os produtos seguintes como sólidos vítreos limpidos: as fracções 38-40 produziram 3,2 mg de 6-desoxi-eritromicina C; as fracções 48-50 produziram 1,9 mg de 6-desoxi-15-noreritromicina A; as fracções 75-80 produziram 0,9 mg de 6-desoxi-15-noreritromicina D; e as fracções 95-121 produziram 3,8 mg de 6-desoxi-eritromicina A.

EXEMPLO 10

Caracterização das 6-Desoxi-eritromicinas A, B, C e D, e das 6-Desoxi-15-noreritromicinas B e D

Os compostos isolados nos exemplos precedentes foram identificados utilizando espectrometria de massa de bombardeamento atómico rápido (Fast Atom Bombardment) (FAB) de alta resolução, RMN de protão e ^{13}C -RMN. Os resultados desses estudos, incluindo os dados dos desvios químicos de ressonância magnética de ^{13}C e de protão, foram sumariados para as 6-desoxi-eritromicinas A, B, C e D e para as 6-desoxi-15-noreritromicinas B e D, e estão registados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. As atribuições para as ressonâncias magnéticas do carbono e do protão foram efectuadas com o auxílio de experiências de 2D-RMN. Os espectros de RMN do protão para as 6-desoxi-15-noreritromicinas A e C não foram colocados em tabelas, mas estão representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Também foram obtidos os espectros de absorção de infra-vermelhos e as rotações ópticas destes compostos, e estão resumidos como se segue:

As rotações ópticas para as 6-desoxi-eritromicinas A, B, C e D são $[\alpha]_D^{23}$ -54,8 (c 0,5, CHCl_3), -74,3 (c 1,2, CHCl_3), -41,0 (c 1,0, CHCl_3) e -77,9 (c 1,3, CHCl_3), respectivamente. As rotações ópticas para as 6-desoxi-15-noreritromicinas B e D são $[\alpha]_D^{23}$ -84,1 (c 1,1, CHCl_3), e -83,3 (c 0,4, CHCl_3), respectivamente.

Os dados de espectroscopia de infra-vermelhos (IV) para a 6-desoxi-eritromicina A indicam os valores seguintes (cm^{-1}) em solução de CDCl_3 : 3 700, 3 550, 3 450 ombro largo, 1 728 forte, 1 705, 1 685 ombro, 1 600 fraco; 6-desoxi-eritromicinas B e D em CDCl_3 : 3 680 fraco 3 540 largo, 1 722, 1 702 forte; 6-desoxi-eritromicina C em CDCl_3 : 3 700, 3 520 forte, largo, 1 728 forte, 1 705, 1 685 ombro, 1 600 fraco; 6-desoxi-eritromicina D em solução de CDCl_3 : 3 680, 3 570 forte, largo, 1 722, 1 700 forte; e 6-desoxi-15-noreritromicina D em CDCl_3 : 3 630, 3 510 forte, largo, 1 725, 1 702 forte, largo.

(segue tabela)

TABELA 1

<u>Composto</u>	<u>m/z</u>	<u>Fórmula calculada</u>	<u>Peso molecular calculado</u>
No. 1	718,75*	C ₃₇ H ₆₈ NO ₁₂	718,4741
No. 2	702,4785	C ₃₇ H ₆₈ NO ₁₁	702,4792
No. 3	704,75*	C ₃₆ H ₆₆ NO ₁₂	704,4585
No. 4	688,4650	C ₃₆ H ₆₆ NO ₁₁	688,4636
No. 5	688,4628	C ₃₆ H ₆₆ NO ₁₁	688,4636
No. 6	674,4439	C ₃₅ H ₆₄ NO ₁₁	674,4479

No. 1 = 6-desoxi-eritromicina A

No. 2 = 6-desoxi-eritromicina B

No. 3 = 6-desoxi-eritromicina C

No. 4 = 6-desoxi-eritromicina D

No. 5 = 6-desoxi-15-noreritromicina B

No. 6 = 6-desoxi-15-noreritromicina D.

* = medição de baixa resolução

TABELA 2

Registos dos desvios químicos de ^{13}C para as 6-desoxi-eritromicinas A-D e 6-desoxi-15-noreritromicinas B e D

	A	B	C	D	E	F
1	176,8	177,4	176,5	177,1	177,0	176,7
2	45,0	45,0	45,2	45,0	44,7	44,9
3	78,4	80,2	81,2	82,8	79,2	82,1
4	44,2	43,3	44,0	44,0	43,4	43,2
5	83,4	84,2	84,2	84,9	84,0	84,8
6	35,1	36,7	35,2	36,7	35,7	36,1
7	34,4	34,3	34,2	34,2	34,3	34,2
8	45,7	45,1	45,8	45,1	45,2	45,3
9	220,1	216,8	220,0	216,7	217,4	217,2
10	38,9	41,6	38,7	41,5	41,1	41,2
11	69,6	70,1	69,5	70,1	70,3	70,5
12	75,0	40,5	74,9	40,6	41,9	42,0
13	77,6	76,0	76,4	76,4	70,4	70,6
14	21,1	25,4	20,9	25,4	18,1	18,3
15	11,0	10,5	10,9	10,5	----	----
2CH ₃	15,0	15,1	15,4	15,3	14,2	14,6
4CH ₃	9,5	9,4	9,7	9,7	9,5	9,7
6CH ₃	18,7	19,9	18,7	20,0	19,5	19,8
8CH ₃	17,4	16,7	17,4	16,7	16,7	16,8
10CH ₃	11,0	7,8	10,9	7,7	7,9	7,8
12CH ₃	16,1	9,0	16,1	9,1	8,6	8,7
1'	104,1	104,2	104,9	105,0	104,2	105,0
2'	70,7	70,6	70,5	70,5	70,6	70,4
3'	65,6	65,6	65,7	65,8	65,7	65,7
4'	28,6	29,1	28,4	28,5	28,8	28,5
5'	69,2	69,0	69,5	69,4	69,1	69,4
6'	21,3	21,1	21,3	21,2	21,4	21,2
N(CH ₃) ₂	40,3	40,3	40,3	40,3	40,3	40,2
1''	96,7	97,6	99,2	99,8	97,0	99,5
2''	35,0	35,2	40,5	40,6	35,1	40,6
3''	72,6	72,5	69,5	69,5	72,5	69,6
4''	78,0	78,0	76,4	76,4	78,0	76,4
5''	65,7	65,7	66,5	66,6	65,6	66,6
6''	18,2	18,1	18,0	18,0	18,2	18,0
3'''CH ₃	21,5	21,4	25,5	25,5	21,2	25,6
OCH ₃	49,4	49,3	----	----	49,3	----

A = 6-Desoxi-eritromicina A

B = 6-Desoxi-eritromicina B

C = 6-Desoxi-eritromicina C

D = 6-Desoxi-eritromicina D

E = 6-Desoxi-15-noreritromicina B

F = 6-Desoxi-15-noreritromicina D

TABELA 3
Atribuições de RMP

PROTÃO	A	B	C	D	E	F
2	2,80	2,86	2,83	2,90	2,78	2,82
3	3,65	3,64	3,70	3,71	3,68	3,74
4	1,60	1,72	1,60	1,74	1,76	1,76
5	3,48	3,44	3,42	3,40	3,48	3,42
6	1,36	1,54	1,33	1,53	1,55	1,53
7a	1,69	1,81	1,68	1,81	1,80	1,80
7b	1,53	1,26	1,57	1,30	1,32	1,35
8	2,63	2,60	2,62	2,61	2,61	2,62
10	3,07	2,84	3,06	2,85	2,90	2,90
11	3,40	3,54	3,34	3,52	3,55	3,51
12	-----	1,69	-----	1,71	1,60	1,63
13	4,93	5,15	4,94	5,17	5,40	5,44
14a	1,93	1,76	1,93	1,78	1,27	1,29
14b	1,50	1,48	1,50	1,49	-----	-----
15	0,89	0,90	0,88	0,91	-----	-----
2CH ₃	1,19	1,19	1,22	1,22	1,18	1,21
4CH ₃	1,17	1,17	1,13	1,14	1,17	1,15
6CH ₃	1,17	1,21	1,18	1,24	1,21	1,23
8CH ₃	1,18	1,13	1,19	1,17	1,15	1,16
10CH ₃	1,15	1,01	1,16	1,02	1,00	1,02
12CH ₃	1,10	0,83	1,10	0,84	0,86	0,87
1'	4,23	4,20	4,17	4,17	4,21	4,18
2'	3,25	3,24	3,22	3,21	3,23	3,20
3'	2,48	2,56	2,46	2,48	2,52	2,50
4'a	1,25	1,28	1,25	1,25	1,26	1,26
4'e	1,67	1,72	1,68	1,67	1,69	1,68
5'	3,46	3,46	3,49	3,48	3,46	3,48
6'	1,24	1,23	1,24	1,23	1,23	1,23
N(CH ₃) ₂	2,29	2,34	2,28	2,28	2,30	2,29
1''	4,88	4,83	5,03	4,99	4,81	4,98
2''a	1,55	1,55	1,83	1,86	1,54	1,84
2''e	2,36	2,36	2,20	2,20	2,33	2,19
4''	3,00	2,99	2,98	2,98	2,97	2,98
5''	3,92	3,93	3,76	3,78	3,89	3,77
6''	1,28	1,27	1,34	1,34	1,26	1,34
OCH ₃	3,28	3,26	-----	-----	3,26	-----
3''CH ₃	1,12	1,22	1,26	1,25	1,22	1,26

A = 6-Desoxi-eritromicina A

B = 6-Desoxi-eritromicina B

C = 6-Desoxi-eritromicina C

D = 6-Desoxi-eritromicina D

E = 6-Desoxi-15-noreritromicina B

F = 6-Desoxi-15-noreritromicina D

EXEMPLO 11Estabilidade em meios ácidos da 6-desoxi-eritromicina A

A estabilidade relativa em meios ácidos de um dos compostos do presente invento foi comparada com a da eritromicina A. Suspenderam-se 11,8 mg de 6-desoxi-eritromicina A numa solução de ácido cítrico (pH 2,2) e deixou-se repousar a 37°C durante 8 horas. Foram removidas aliquotas aos 2, 5, 10 e 20 minutos e às 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas. A degradação foi extinta por ajuste de cada aliquota a pH 9,6 com NH₄OH 7,5 N, seguida por extracção com diclorometano.

De forma idêntica, suspenderam-se 10,5 mg de eritromicina A numa solução de ácido cítrico (pH 2,0), e deixou-se repousar a 37°C durante 10 minutos. Foram removidas aliquotas aos 2, 5 e 10 minutos. A degradação foi extinta por ajuste de cada aliquota a pH 9,6 com NH₄OH 7,5 N, seguida pela extração com diclorometano.

Os extractos de diclorometano de 6-desoxi-eritromicina A e eritromicina A foram analisados por TLC, tal como descrito no Exemplo 7. Os resultados da TLC indicam que permaneciam menos do que 10% da eritromicina A, após 2 minutos a pH 2,2, enquanto que persistiam mais do que 50% da 6-desoxi-eritromicina A após 4 horas de exposição a pH 2,2. Mesmo depois de 8 horas, verificou-se que aproximadamente 40% da 6-desoxi-eritromicina A permanecia intacta, mostrando um melhoramento substancial da solubilidade em meios ácidos dos compostos do presente invento em relação à própria eritromicina A.

EXEMPLO 12Actividade Anti-bacteriana

As 6-desoxi-eritromicinas A, B e C e a 6-desoxi-15-noreritromicina B foram testadas quanto à actividade anti-bacteriana, utilizando um processo de diluição de placa de ágar padrão em caldo de infusão de coração-cérebro. A eritromicina A foi utilizada como um controlo. Os resultados, indicados como as concentrações inibitórias mínimas (MIC), estão representados nas Tabelas 4 e 5, abaixo.

TABELA 4

Valor da MIC do Espectro Anti-bacteriano (mcg/ml)

<u>Microorganismo</u>	<u>A</u>	<u>dA</u>	<u>dC</u>
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	0,25	1	2
Staphylococcus aureus NCTC 10649	0,25	1	2
Staphylococcus aureus CMX 553	0,25	0,5	4
Staphylococcus epidermis 3519	0,5	1	4
Micrococcus luteus ATCC 9341	0,03	0,06	0,25
Streptococcus agalactiae CMX 508	0,06	0,12	0,25
Streptococcus pyogenes EES61	0,03	0,25	0,5
Escherichia coli JUHL	64	>128	>128
Escherichia coli SS	1	2	16
Enterococcus faecium ATCC 8043	0,12	0,25	0,25

A = Eritromicina A

dA = 6-Desoxi-eritromicina A

dC = 6-Desoxi-eritromicina C

TABELA 5

Valor da MIC do Espectro Anti-bacteriano (mcg/ml)

<u>Microorganismo</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>dB</u>	<u>dnB</u>
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	0,12	0,25	1	2
Staphylococcus aureus NCTC 10649	0,12	0,25	1	2
Staphylococcus aureus CMX 553	0,12	0,25	1	2
Staphylococcus epidermis 3519	0,12	0,25	1	2
Micrococcus luteus ATCC 9341	0,015	0,03	0,12	0,25
Streptococcus agalactiae CMX 508	0,03	0,03	0,25	0,5
Streptococcus pyogenes EES61	0,015	0,03	0,12	0,25
Escherichia coli JUHL	32	32	>128	>128
Escherichia coli SS	1	2	4	2
Enterococcus faecium ATCC 8043	0,06	0,12	0,5	2

A = Eritromicina A

B = Eritromicina B

dB = 6-Desoxi-eritromicina B

dnB = 6-Desoxi-15-noreritromicina B

EXEMPLO 13Actividade Anti-bacteriana In vivo

A actividade in vivo da 6-desoxi-eritromicina A foi avaliada utilizando o teste de protecção do ratinho, agudo. A mortalidade do ratinho foi utilizada para calcular um valor de ED₅₀, isto é, a dose de droga necessária para proteger 50% dos animais de teste contra a morte devida ao desafio do inóculo.

O teste de protecção do ratinho, agudo, foi conduzido tal como descrito por Fernandes e colab. (Antimicrob. Agents Chemother., 29:201-208 (1986)), em ratinhos CF-1 fêmea, pesando 20-25 gramas. Os ratinhos foram injectados intraperitonealmente com suspensões bacterianas numa concentração 100 vezes superior á quella que produz uma resposta LD₅₀. A 6-desoxi-eritromicina A ou a eritromicina A foram administradas oralmente 1 e 5 horas após a infecção. As doses eficazes médias para as mortalidades cumulativas no sexto dia após a infecção foram calculadas utilizando um "trimmed logit analysis" (Hamilton e colab., Environ. Sci Technol., 11:714-719 (1977)). Os resultados desta análise, representados na Tabela 6, abaixo, indicam que a 6-desoxi-eritromicina A é tão eficaz como a eritromicina A quando administrada oralmente contra infecções murinas de Staphylococci e Streptococci.

TABELA 6

Actividade In vivo da 6-Desoxi-eritromicina A após Administração Oral (Dose Proporcionando Sobrevivência de 50% em mg/kg)

<u>Estirpe bacteriana</u>	<u>dA</u>	<u>A</u>
Staphylococcus aureus 10649	90,8	119,6
Streptococcus pneumoniae 6303	24,9	24,8
Streptococcus pyogenes C203	32,4	54,5

dA = 6-desoxi-eritromicina A

A = eritromicina A

um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável, caracterizado por compreender o passo de cultivar um microorganismo capaz de biossintetizar o composto.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o microorganismo ser um membro do género Saccharopolyspora.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por o microorganismo ter todas as características identificadoras de Saccharopolyspora erythraea UW110::pMW56-H23.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o microorganismo ser um transformante de um microorganismo produtor de eritromicina que é deficiente na hidroxilação em C-6 durante a biossíntese de eritromicina.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o transformante ser produzido por integração de um plasmídeo de ADN no microorganismo.

8 - Processo de preparação de 3- α -micarosil-6-desoxi-eritronolido B, caracterizado por compreender o passo de cultivar um microorganismo capaz de biossintetizar o referido composto.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o microorganismo ser um membro do género Saccharopolyspora.

10 - Processo para a transformação de um microorganismo produtor de eritromicina num microorganismo deficiente na hidroxilação em C-6 durante a biossíntese de eritromicina, caracterizado por compreender os passos de (a) preparar um plasmídeo de ADN recombinante compreendendo uma sequência de nucleótidos que é homóloga a uma porção do genoma do microorganismo e (b) integrar o plasmídeo no genoma do microorganismo.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o microorganismo ser um membro do género Saccharopolyspora.

72 468

4802.PG.01

-36-

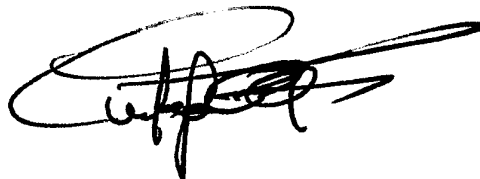
12 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracteriza-
do por o plasmídeo de ADN ser pMW56-H23.

Lisboa,

17. APR. 1991.

Por ABBOTT LABORATORIES

- O AGENTE OFICIAL -



1/10

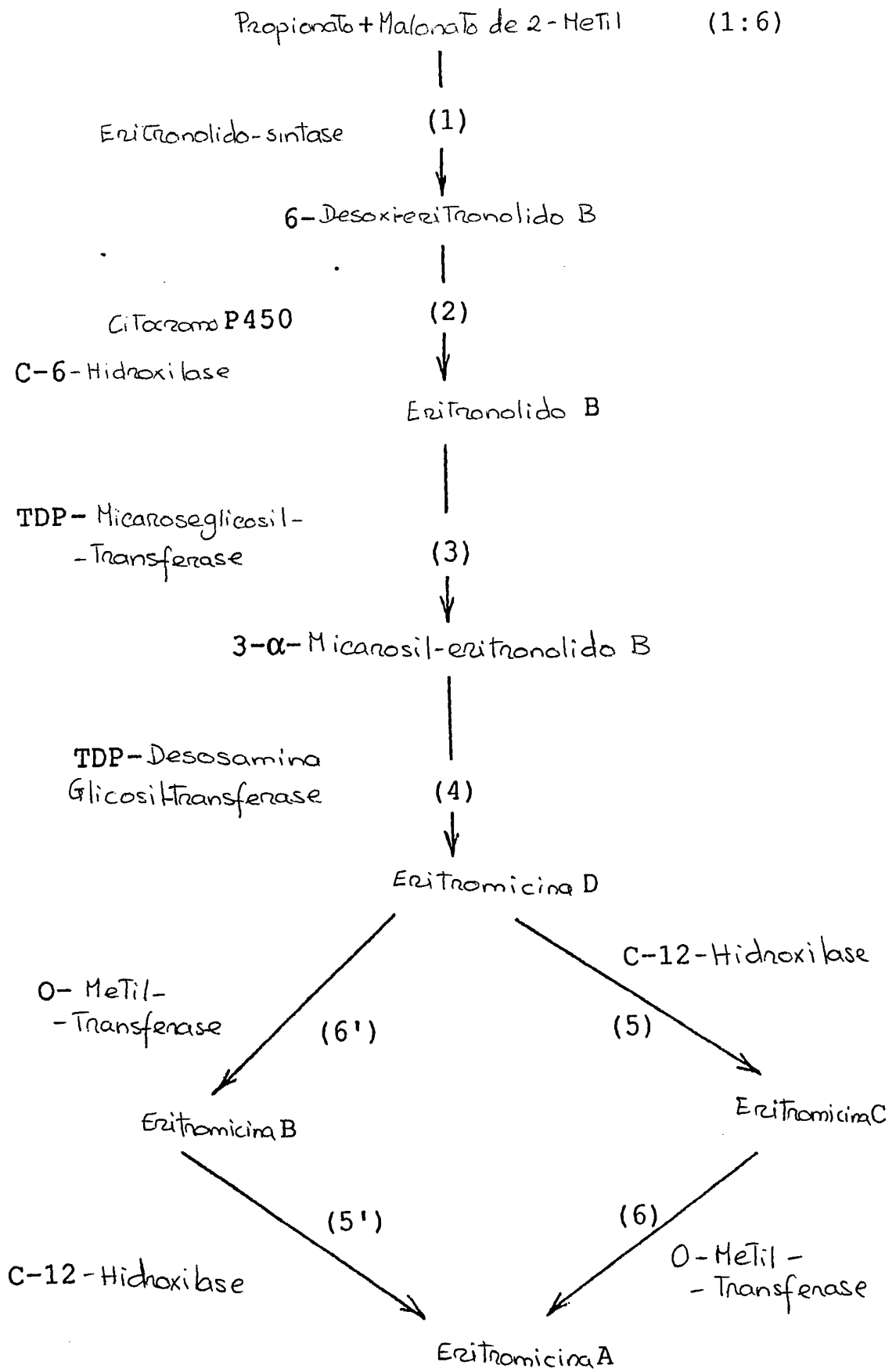


FIG. 1

CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pMW56-H23
 A partir do cromossomo de *S. erythraeus* NRRL2338

DNA

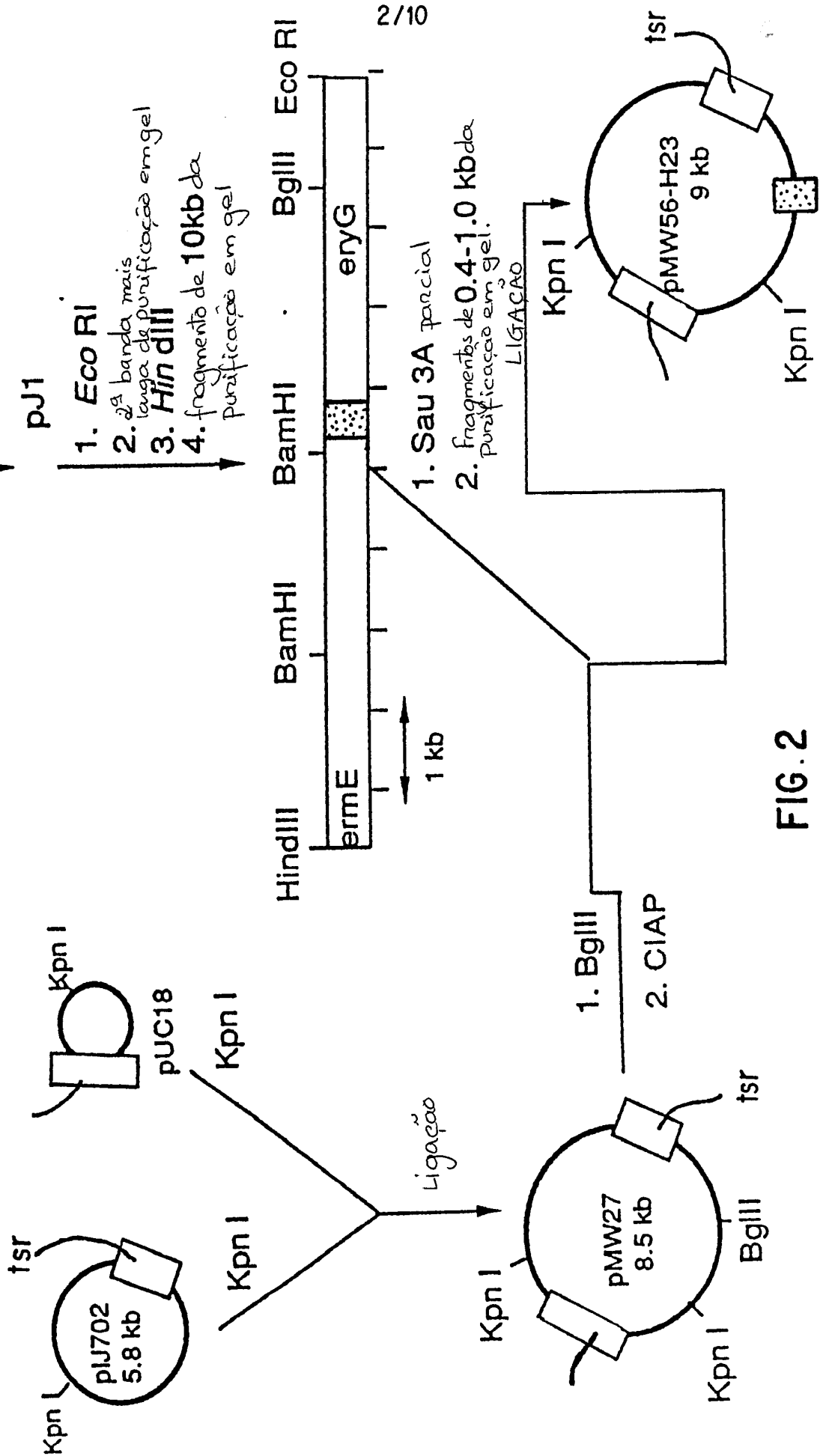


FIG. 2

Sequência de ADN do gene *eryF* responsável pela hidroxilação em C-6
em *S. erythraea*.

GGATC CCGAT CGTGT CCGAG GAAGA GGCCA AGTCG CGCCG CCCC G ACCAG
CTGCT GGTGC TGCCC TGGAT CTACC GCGAC GGGTT CGTCG AACGC GAGCA
GGAGT TCCTC GCTGG CGGCG GAAAG CTGAT CTTC CCCTA CCCC ACTGG
AAGTC GTATG ACGAC CGTTC CCGAT CTCGA AAGCG ACTCC TTCCA CGTCG
ACTGG TACCG CACCT ACGCC GAGCT GCGCG AGACC GCGCC GGTGA CGCCG 250

GTGCG CTTCC TCGGC CAGGA CCGGT GGCTG GTCAC CGGCT ACGAC GAGGC
GAAGG CCGCG CTGAG CGACC TGCGC CTGAG CAGCG ACCCG AAGAA GAAGT
ACCCG GGCCT GGAGG TCGAG TTCCC GGCAT ACCTC GGTTT CCCC AGGAC
GTGCG GAACT ACTTC GCCAC CAACA TGGGC ACCAG CGACC CGCCG ACCCA
CACCC GGCTG CGCAA GCTGG TGTCG CAGGA GTTCA CCGTC CGCCG CGTGG 500

3/10

AGGCG ATGCG GCCCC GCGTC GAGCA GATCA CCGCG GAGCT GCTCG ACGAG
GTGGG CGACT CCGGC GTGGT CGACA TCGTC GACCG CTTCG CCCAC CCGCT
GCCCC TCAAG GTCAT CTGCC AGCTG CTCGG CGTCG ACGAG AAGTA CCGCG
GGGAG TTCGG GCGGT GGAGC TCGGA GATCC TGGTC ATGGA CCCC AGCGG
GCCCC ACAGC GCGGG CAGGC GGCCA GGGAG GTCGT CAACT TCATC CTCGA 750

FIG. 3A

CCTGG TCGAG CGCCG CCGCA CCGAG CCCGG CGACG ACCTG CTGTC CGCGC
 TGATC AGGGT CCAGG ACGAC GATGA CGGTC GGCTC AGCGC CGACG AGCTG
 ACCTC CATCG CGCTG GTGCT GCTGC TGGCC GGTTT CGAGG CGTCC GTGAG
 CCTCA TCGGG ATCGG CACCT ACCTG CTGCT CACCC ACCCG GACCA GCTCG
 CGCTG GTGCG GCGGG ACCCG TCGGC GCTGC CCAAC GCCGT CGAGG AGATC 1000

CTGCG CTACA TCGCT CCGCC GGAGA CCACC ACGCG CTTCG CCGCG GAGGA
 GGTGG AGATC GCGGG TGTCG CGATC CCCC A GTACA GCACG GTGCT GGTCG
 CGAAC GCGCG GGCCA ACCGC GACCC GAAGC AGTTC CCGGA CCCCC ACCGC
 TTCGA CGTCA CCCGC GACAC CCGCG GCCAC CTGTC GTTCG GGCAG GGCAT
 CCACT TCTGC ATGGG CCGGC CGCTG GCCAA GCTGG AGGGC GAGGT GCGCG 1250

4/10

TGGCG GCGCT GTTCG GCCGC TTCCC CGCTC TGTCG CTGGG AATCG ACGCC
 GACGA CGTGG TGTGG CGGCG TTCGC TGCTG CTGCG GGGCA TCGAC CACCT
 ACCGG TGGCG CTCGA CCGAT GAGCA CCTGG CTGCG GCGGT TCGGT CCTCC

Codão de partida = ATG (bp 158-169)
 Codão de paragem = TGA (bp 1370-1372)
 Impressão a negrito = Gene *eryF*

FIG. 3B

Seqüência de reconhecimento de 503 bp do Plasmídeo de Integração pMW56-H23

	10	20	30	40	50
GATCT	CGAAA	GCGAC	TCC TT	CCAGG	TCGAC
GCTGC	GCGAG	ACCGC	GCCGG	TGACG	CCGGT
CGTGG	CTGGT	CACCG	GCTAC	GACGA	GGCGA
CGCCT	GAGCG	ACCCG	AAGAA	GAAGT	ACCCG
GGCAT	ACCTC	GGTTT	CCCCG	AGGAC	GTGCG
					GAACT
					ACTTC
					GCCAC
					CAACA
					250
TGGGC	ACCAG	CGACC	CGCCG	ACCCA	CACCC
CAGGA	GTTCA	CCGTC	CGCCG	CGTGG	AGGCG
GATCA	CCGCG	GAGCT	GCTCG	ACGAG	GTGGG
TCGTC	GACCG	CTTCG	CCCAC	CCGCT	GCCCA
CTCGC	GTCGA	CGAGA	AGTAC	CGCGG	GGAGT
					TCGGG
					CGGTG
					CGCAA
					GGCTG
					CGCAA
					GCCCC
					GCGTC
					GAGCA
					CGGTC
					GTGGT
					CGACA
					CTGCC
					AGCTG
					CGGAG
					500

5/10

ATC

FIG. 4

MAPA DE RESTRIÇÃO do PLASMÍDEO pMW56-H23

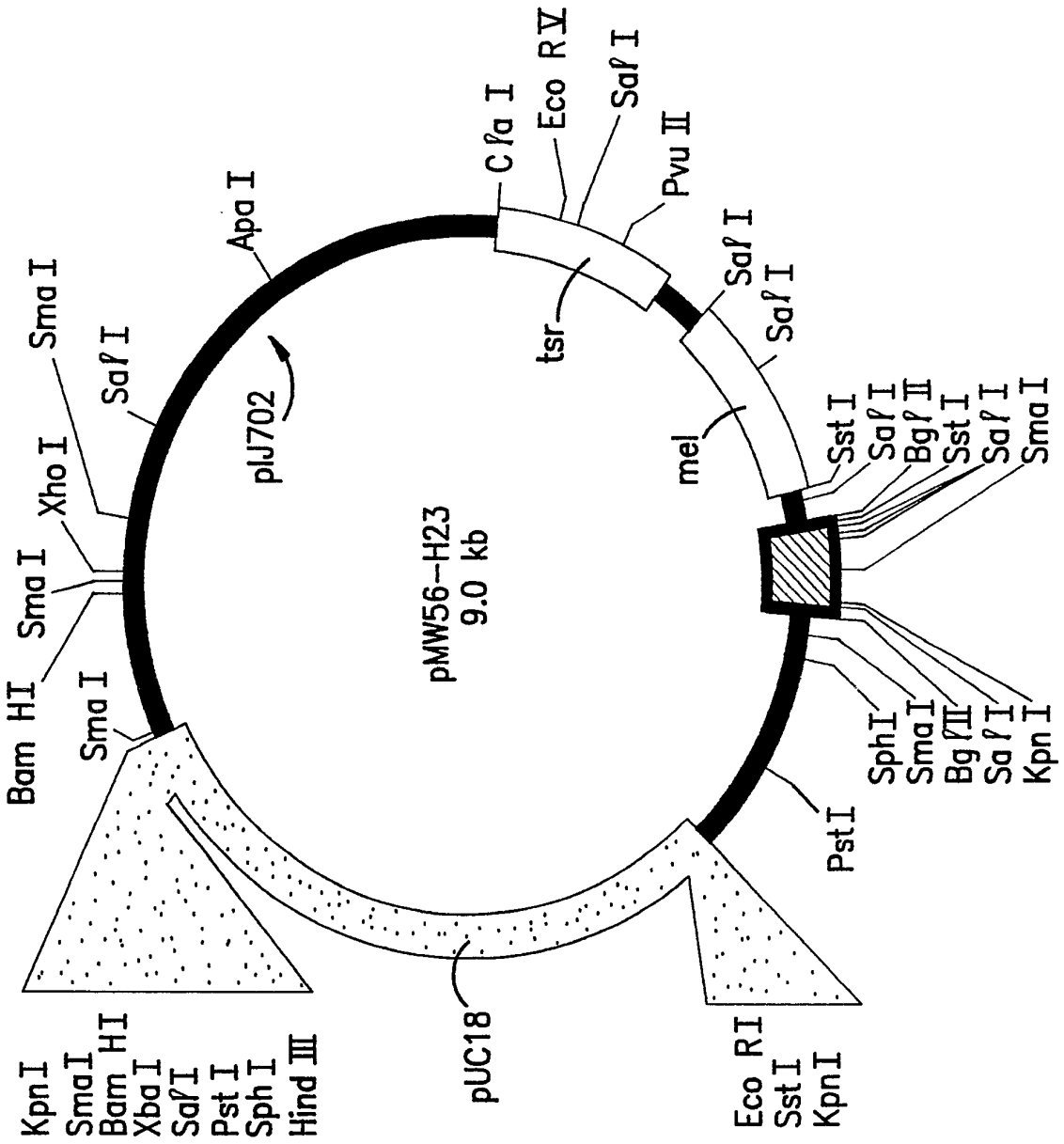
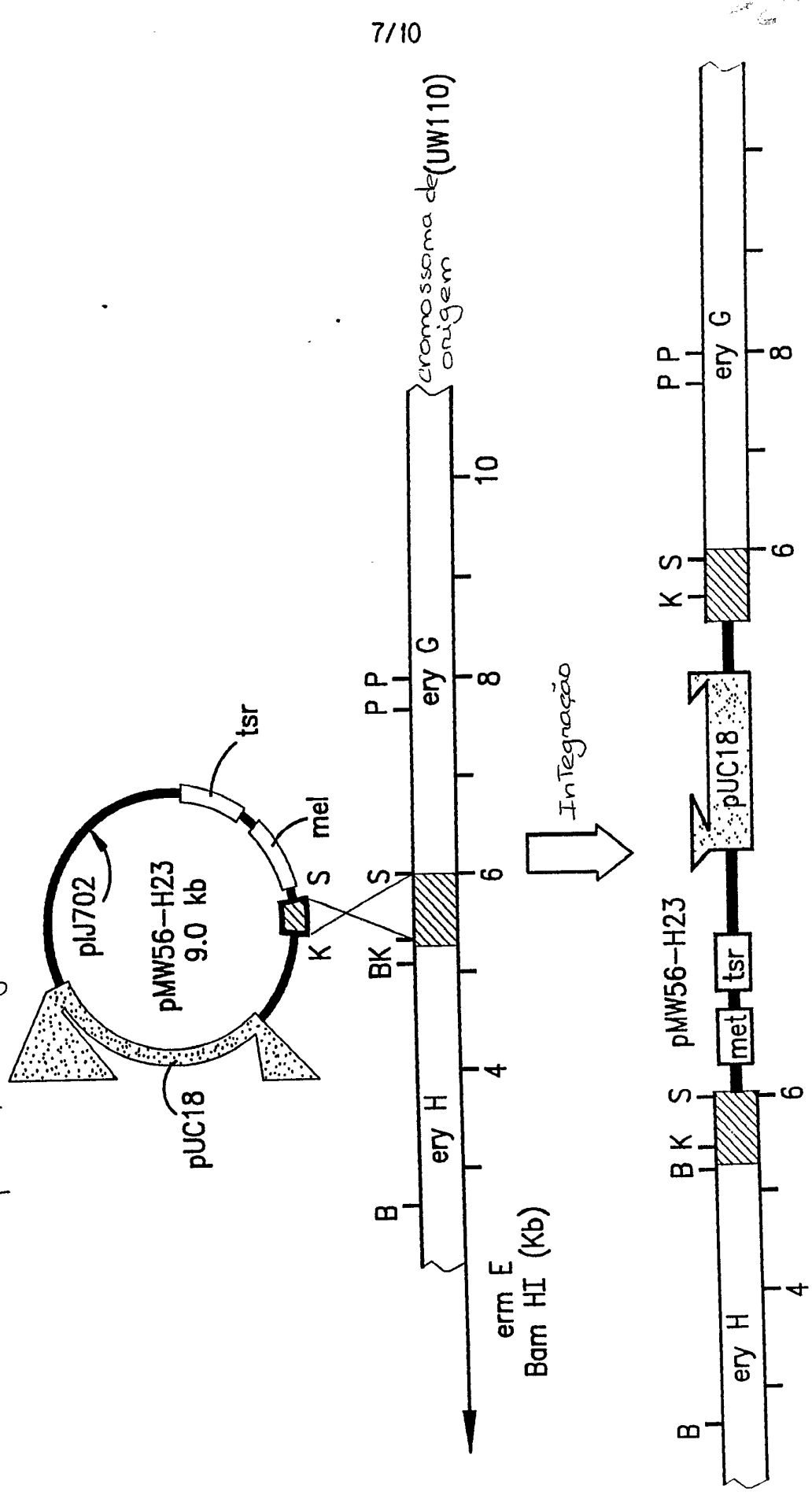


FIG.5

Transformação Integrante de *S. erythraea* pelo plasmídeo pMW56-H23



chromossoma transformante (UW110 :: pMW56-H23)

FIG.6

Hapa cromossômico do cacho do gene biossintético da eritromicina de *S. erythraea*

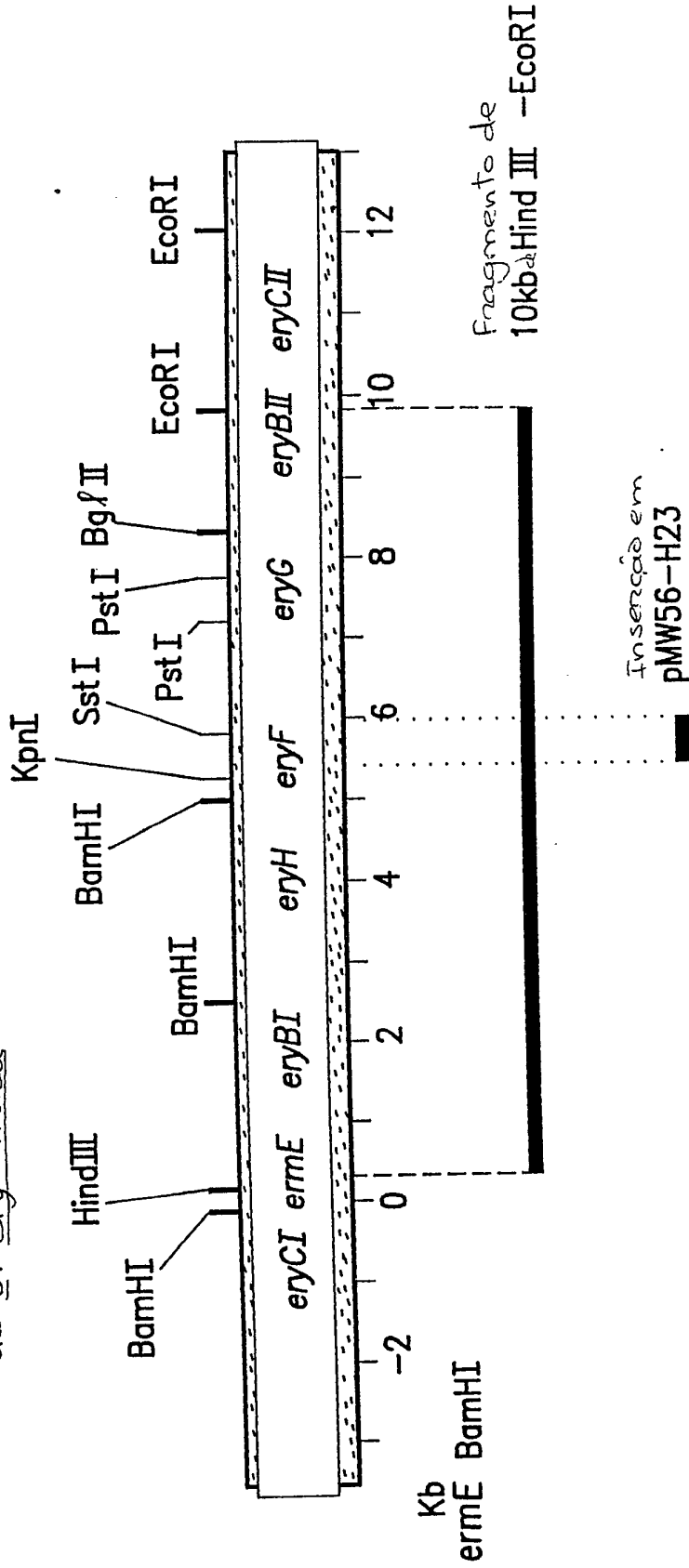


FIG.7



[Handwritten signature]

9/10

Espectro de RMN de próton, a 500 MHz,
de 6-Desoxi-15-norze ritromicina A

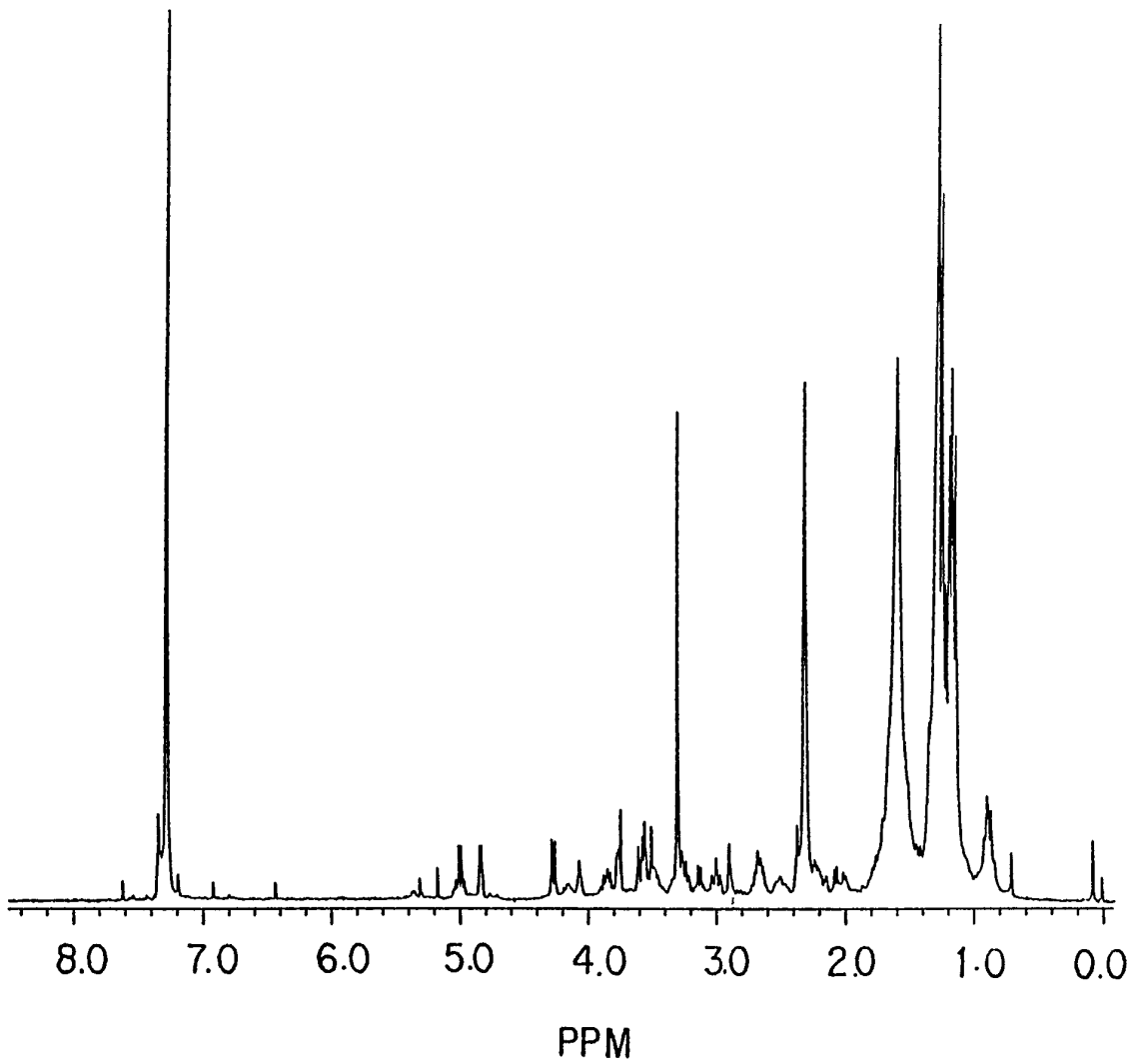


FIG. 8

[Handwritten signature]

10/10

Espectro de RMN de Prótons, a 500MHz,
de 6-Desoxi-15-norazetromicina C

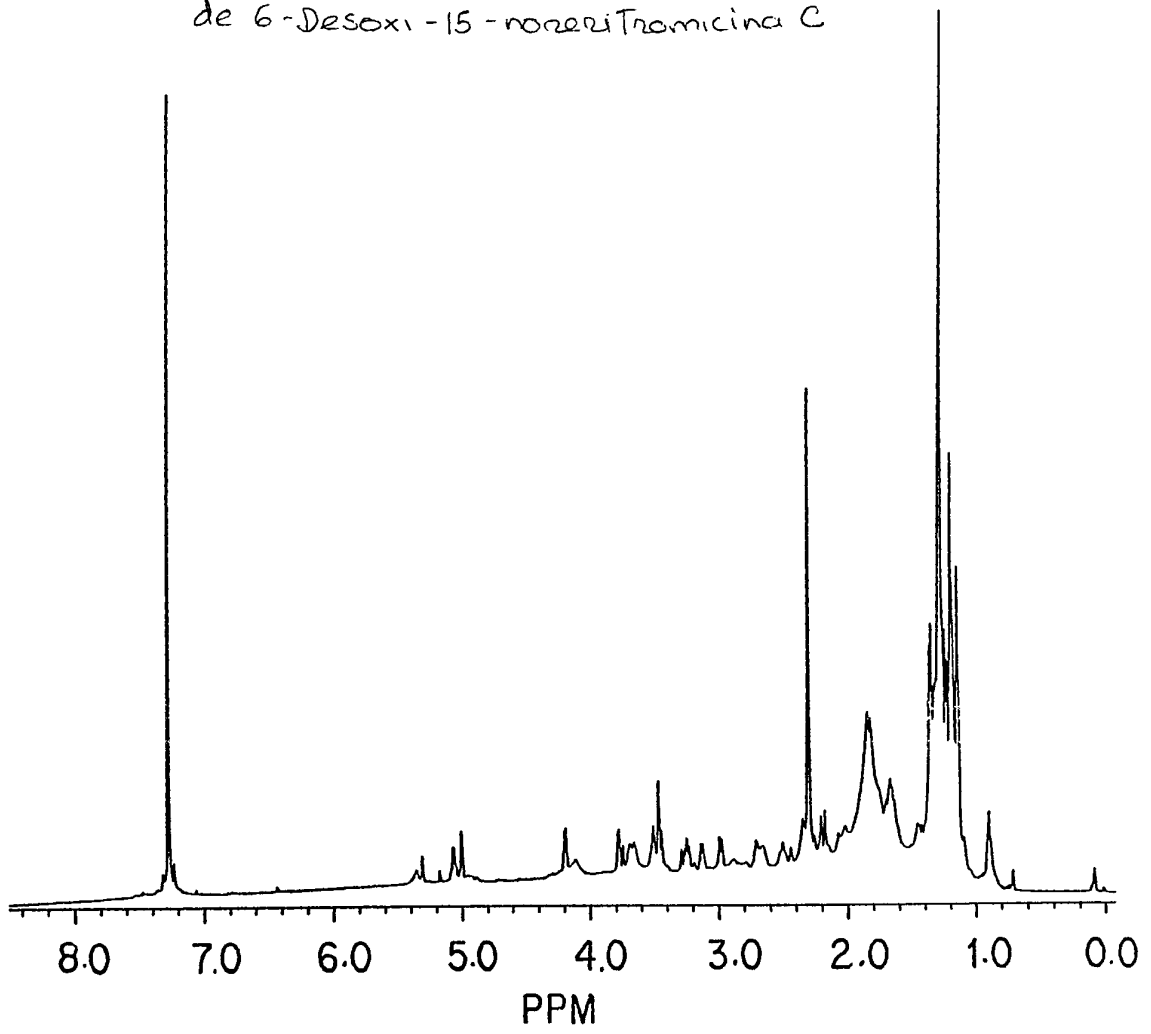


FIG. 9