

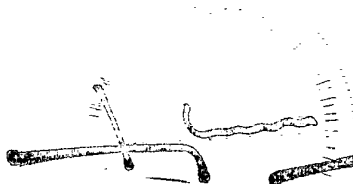
MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

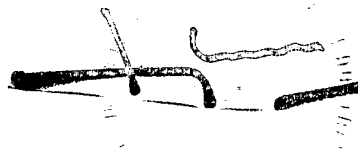
O presente invento diz respeito a processo para a produção de agliconas de avermectina naturais e não-naturais úteis como parasiticidas, utilizando mutantes de Streptomyces avermitilis sem capacidade para produzirem avermectinas glicosiladas e não possuindo actividade de desidrogenase de 2-oxo-ácido de cadeia ramificada.

=====
PFIZER INC.

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE AGLICONAS DE AVERMECTINA"



O processo consiste em se proceder à fermentação aeróbica de uma estirpe de Streptomyces avermetilis num meio nutriente aquoso que compreende uma fonte assimilável de azoto, carbono e sais inorgânicos e um composto capaz de ser utilizado na biossíntese de agliconas de avermectina.



Este invento refere-se a mutantes de Streptomyces avermitilis que não possuem a capacidade de produzir avermectinas glicosiladas, nem a actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada, a processos para a preparação das referidas S. avermitilis e à sua utilização para a produção de agliconas de avermectina naturais e não-naturais.

As Patentes Norte Americanas 4.310.519 e 4.429.042 descrevem as avermectinas, um complexo de agentes afins que possuem uma forte actividade anti-parasitica, e a sua produção por fermentação aeróbica de estirpes de Streptomyces avermitilis; nomeadamente S. avermitilis ATCC Nos. 31267, 31271 e 31272. As duas últimas estirpes citadas representam uma frasco congelado e um tubo liofilizado, respectivamente de uma cultura obtida por radiação de ultravioletas de S. avermitilis ATCC 31267.

A PE 214.731, publicada em 18 de Março de 1987, o Pedido correspondente da Patente Norte Americana com o No. de Série 886.867, depositado em 16 de Julho de 1986, divulga uma série de compostos (designados aqui como avermectinas não-naturais) afins de avermectinas naturais ou conhecidas, mas que possuem um novo grupo substituinte na posição-25, e um processo para a sua preparação por fermentação de um organismo de produção de avermectina na presença de determinados ácidos carboxílicos específicos ou seus derivados ou precursores. São também divulgadas as agliconas das referidas avermectinas e a sua preparação por hidrólise ácida suave das avermectinas não-naturais. Os organismos S. avermitilis utilizados para produzir as referidas novas avermectinas substituídas em C-25 são S. avermitilis ATCC 31267, 31271, 31272 e NCIB 12121. O último organismo derivado de S. avermitilis ATCC 31271, proporciona produções aumentadas das novas avermectinas substituídas em C-25, quando é cultivado num meio semi-definido. Cada uma



de ATCC 31267, 31271, 31272 e NCIB 12121 pode também produzir, para além dos novos derivados substituídos em C-25, variadas quantidades de avermectinas conhecidas ou naturais em que o substituinte -25 é isopropilo ou (S)-sec-butil (1-metilpropil).

A estrutura dos carbonos das avermectinas (definida na fórmula (I) apresentada a seguir) é derivada de acetatos e propionatos e do substituinte em C-25 de avermectinas naturais de L-isoleucina (R = (S)-sec-butilo) ou L-valina (R = isopropilo) [Fischer e Mrozik, "Antibióticos Macrólidos", Academic Press (1984) Ch. 14_7.

Por avermectinas "conhecidas" ou "naturais" pretende-se significar aquelas avermectinas produzidas por S. avermitilis ATCC 31267, ATCC 31271 e ATCC 31272 em que o substituinte da posição-25 é isopropilo ou (S)-sec-butil-(1-metilpropilo). As avermectinas em que o substituinte da posição-25 é diferente de isopropilo ou sec-butilo (forma-S) são aqui designadas por avermectinas novas ou não-naturais.

As estirpes de S. avermitilis citadas nas patentes atrás mencionadas produzem uma classe de substâncias descritas genericamente aí como C-076. A classe compreende oito compostos distintos mas muito afins descritos como C-076 Ala, Alb, A2a, A2b, Bla, Blb, B2a e B2b. As séries de compostos "a" referem-se às avermectinas naturais em que o substituinte-25 é (S)-sec-butilo e as séries "b" àqueles em que o substituinte-25 é isopropilo. As designações "A" e "B" referem-se às avermectinas em que o substituinte-5 é metoxi ou hidroxí, respectivamente. Finalmente, o número "1" refere-se a avermectinas em que a ligação dupla está localizada na posição 22-23; e o número "2" refere-se a avermectinas possuindo um hidrogénio na



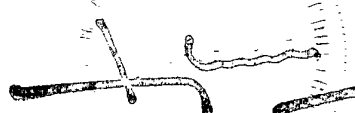
posição-22 e hidroxí na posição-23.

Neste pedido, os identificadores "a" e "b" não foram considerados. Os identificadores A1, A2, B1 e B2 foram mantidos para referir as avermectinas não-naturais possuindo as características estruturais correspondentes às das avermectinas naturais, conforme indicado atrás.

A produção de mutantes desprovidos de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada foi referida para Bacillus subtilis, Willecke e Pardee, J. Biol. Chem. 246, 5264-72 (1971) e Pseudomonas putida, Martin et al., J. Bacteriology, 115 198-204 (1973) mas não para Streptomyces.

A Patente Norte Americana 4.206.205 descreve os derivados de monossacrideo e de aglicona de C-076; i.e., derivados de C-076 em que uma ou ambas as metades de carbohidrato da 4-(alfa-L-oleandrosil)-alfa-L-oleandrose da função dissacarideo ligada a C-13 do anel macrólido foi removida por hidrólise num solvente orgânico não-nucleofílico aquoso na presença de um ácido, preferivelmente ácido sulfurico.

A S. avermitilis Agli-1, uma estirpe que produz virtualmente apenas agliconas de avermectina A1a e A2a, é referida por Schulman et al., J. Antibiot. 38 (11), 1494-1498 (1985). É também referida a fermentação de S. avermitilis Agli-1 na presença de sinefungina que causa o aumento da produção de componentes de aglicona de avermectina B. Da mesma forma, a S. avermitilis 08, uma estirpe de elevada produção de avermectinas, quando fermentada na presença de sinefungina como inibidor de transferases de O-metilo, resultou na produção de avermectinas sem grupos O-metilicos na aglicona em C-5 e na metade de dissa-

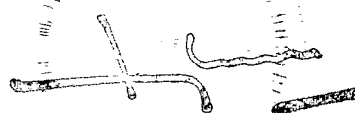


cárido de oleandrose.

A Patente Norte Americana 4.378.353 descreve compostos afins de C-078 e a sua preparação por cultura de MA-5218, uma estirpe mutante de S. avermitilis ATCC 31272, obtida a partir dela por radiação ultravioleta. O mutante é identificado como ATCC 31780. Os compostos afins de C-076 produzidos pelo referido mutante apresentam maiores diferenças estruturais relativamente aos compostos C-076. Nenhum dos produtos possui o anel furano de C-076. Além disso, em alguns dos compostos referidos, uma ou mais das metades de açúcar de oleandrose foi clivada, enquanto que noutros o grupo da posição-5 foi oxidado num grupo ceto.

Três classes de mutantes de O-metiltransferase de S. avermitilis que produzem avermectinas sem grupos O-metilo foram referidas por Ruby et al. 6º Simpósio Internacional sobre "Biologia de Actinomicetes", Debrecen, Hungria, 26-30 de Agosto de 1985 e por Schulman et al., Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia 31, 744-7 (1987). A primeira classe produz em primeiro lugar avermectinas B devido à sua incapacidade em metilar o hidroxilo C-5 do anel de lactina, macrocíclico. A segunda classe produz 3'-O, 3"-O-bis-demetilavermectinas (avermectinas que não possuem o substituinte O-metilo na posição 3 de ambos os resíduos monossacarídeos de oleandrose), que são designadas por demetilavermectinas. A terceira classe é incapaz de metilar em qualquer posição.

Schulman et al., Fed. Proc. 44, 931 (1985) divulga uma maior produção de avermectinas por fermentação de S. avermitilis na presença de substâncias tais como a sinefungina, S-adenosiletionina e S-adenosilhomocisteína que inibem a metilação do grupo hidroxil C-5 da metade de aglicona por meio do enzima de B-O-metiltransferase de avermectina. Os mutantes de Streptomyces avermitilis



que carecem da actividade de O-metiltransferase e que produzem maiores quantidades de componentes de avermectina B são também divulgados por Schulman et al., em Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia 29, 620-624 (1986).

Descobriu-se agora que a mutagenese de mutantes S. avermitilis que não possuem a actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada produz mutantes que, quando cultivados num meio apropriado, produzem agliconas de avermectinas. Os mutantes não possuem a capacidade de produzir agliconas de avermectina naturais na ausência de compostos RCOOH adicionados, em que R é isopropilo ou (S)-sec-butilo, ou na ausência de um composto convertível em RCOOH durante o processo de fermentação. Surpreendente e inesperadamente, contudo, os mutantes mostraram produzir agliconas de avermectina, naturais e não-naturais, quando fermentados na presença de um composto R-COOH adicionado, em que R é isopropilo ou (S)-sec-butilo, ou outro grupo aqui mencionado, ou de um precursor do referido composto RCOOH. É ainda mais surpreendente que os mutantes aqui descritos, que são incapazes de degradar a L-isoleucina ou L-valina, são capazes de assimilar uma grande variedade de compostos para a via biosintética de avermectina com produção de agliconas de avermectina não-naturais, livres da presença de agliconas de avermectina naturais.

Algumas das agliconas de avermectina naturais, Ala e A2a, são produzidas por S. avermitilis Aglil-1, conforme foi indicado anteriormente. Contudo, elas conjuntamente com as agliconas das avermectinas naturais remanescentes, são normalmente preparadas por hidrólise ácida da avermectina correspondente. Este processo necessita do isolamento das avermectinas naturais dos seus caldos de fermentação. Embora as avermectinas naturais tenham sido isoladas numa forma substancialmente pura (veja-se Pa-

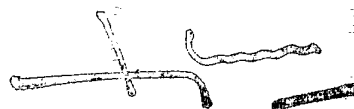
tente Norte Americana 4.429.042) a metodologia é, no melhor laboriosa. A produção completa de agliconas de avermectina por este processo é, no entanto, ainda mais laboriosa, devido à etapa suplementar de hidrólise. A possibilidade de escolher se se pretende produzir agliconas de avermectina naturais ou não-naturais, de modo a minimizar o número e complexidade dos produtos, e dessa forma a aumentar a pureza de uma aglicona de avermectina escolhida, simplificando desta maneira os processos de separação, é um objectivo desejável.

As estirpes de S. avermitilis que não possuem a actividade de desidrogenase do ácido 2-oxo de cadeia ramificada e que são capazes de produzir agliconas quando fermentadas num meio nutriente, são obtidos por mutação de estirpes S. avermitilis que não possuem a actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada. Os mutantes deste invento aqui descritos são incapazes de sintetizar as agliconas de avermectina naturais, excepto quando o ácido gordo, ou um seu precursor, que suporta o grupo isopropilo ou sec-butilo (forma-S) é adicionado ao meio onde os mutantes são fermentados. Eles são capazes de produzir agliconas de avermectina naturais e não-naturais, quando fermentados sob condições aeróbicas aquosas num meio nutriente que contém um ácido primário apropriado ou um composto convertível no mesmo no processo de fermentação. As estirpes deficientes de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada necessárias, por exemplo, S. avermitilis, I-3 (ATCC 53567) são produzidas por mutação de estirpes produtoras de avermectina de S. avermitilis e especialmente por mutação de S. avermitilis ATCC 31267, ATCC 31271, ATCC 31272 ou NCIB 12121.



Os mutantes, caracterizados pela sua carência de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada, são seleccionados entre colónias submetidas a mutação com base num ensaio de $^{14}\text{CO}_2$. Neste processo de ausência de libertação de $^{14}\text{CO}_2$ causada por uma colónia permeabilizada num substrato de ácido $\text{C-}^{14}\text{1}_7\text{-2-oxoisocaproico}$ ou ácido $\text{C-}^{14}\text{1}_7\text{-2-oxo-3-metilvalérico}$ ou ácido $\text{C-}^{14}\text{1}_7\text{-2-oxo-3-metilbutirico}$ indica a ausência de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada. Os mutantes assim produzidos são então submetidos a uma segunda mutação. Eles são então cultivados num meio apropriado na presença de um ácido primário apropriado e os produtos de fermentação são analisados por cromatografia de camada fina (CCF) e/ou cromatografia liquida de alto rendimento (CLAR) relativamente a agliconas. Alternativamente, conforme os técnicos da especialidade reconhecerão os mutantes duplamente bloqueados podem ser produzidos por ordem inversa; i.e.; o bloco de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada pode ser introduzido como segunda etapa em vez de primeira.

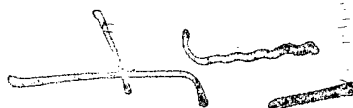
Foi com surpresa que se constatou que os mutantes aqui descritos com carência de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada apresentavam a capacidade de produzir agliconas de avermectina, especialmente agliconas de avermectina não-naturais. A incapacidade dos mutantes deste invento em produzir os derivados gordos e naturais de acilcoenzima A, quando desenvolvidos num meio convencional, poderia resultar numa mutação letal se a integridade da membrana dependesse dos referidos derivados, ou se a acumulação de ácido 2-oxo pelo mutante conduzissem à citotoxicidade. Além do mais, não era de esperar que os mutantes sintetizassem o acetil-CoA e o propionil-CoA a partir do metabolismo degradante da L-isoleucina e da L-valina, na medida em que isso exigiria a presença da actividade enzimática de que os mutantes carecem.



Os requisitos para estes derivados de acil-CoA relativamente à biossíntese de avermectina, indicado anteriormente, levavam a esperar-se que os mutantes pudessem ser severamente impedidos de produzir agliconas de avermectina não-naturais, o que, surpreendentemente não foi o caso.

A falta de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo nos mutantes aqui descritos resulta no impedimento da síntese de acil-CoA gordo de cadeia ramificada degradar a L-isoleucina e a L-valina, e, portanto a síntese das avermectinas naturais. Da mesma forma, espera-se que os mutantes de transaminase de aminoácidos de cadeia ramificada de S. avermitilis reduzam e possivelmente evitem a capacidade de produzir as avermectinas naturais. Estes mutantes de transaminase-negativa não seriam capazes de sintetizar os ácidos 2-oxo de cadeia ramificada a partir de isoleucina e valina, através da via normal de transaminação. A reduzida possibilidade de utilização destes ácidos 2-oxo, que são substractos para o enzima de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada, pode efectivamente impedir a síntese de acil-CoA gordo de cadeia ramificada. Deste modo, o presente invento também abrange a utilização destes mutantes de transaminase-negativa isoladamente, e de mutantes em que ambas as mutações, de transaminase negativa de cadeia ramificada e de desidrogenase-negativa de ácido 2-oxo são combinados.

O presente invento também compreende qualquer organismo, independentemente da sua aparência ou comportamento fisiológico, que possa ser desenvolvido por meio de transformação, transdução, recombinação genética ou por meio de qualquer outro processo genético, utilizando-se um ácido nucleico ou um material equivalente, a partir das espécies aqui descritas, desde que tenha adquirido as características dos mutantes atrás descritos.



Os termos "avermectina" ou "avermectinas" conforme aqui utilizados, referem-se a compostos possuindo a fórmula (I) seguinte, mas em que o substituinte-25 (R) pode ser qualquer grupo assimilável nessa posição pela S. avermitilis deste invento. As agliconas de avermectina referem-se a compostos de fórmula (II) em que a metade de éter de dissacarideo, 4-(alfa-L-oleandrosil)-alfa-L-oleandrosiloxi, em C-13, é substituída por OH.

Os mutantes aqui descritos são muito importantes para a produção de agliconas de avermectina não-naturais pelos processos divulgados e exemplificados aqui. Eles são especialmente importantes para a produção de agliconas de avermectina preferidas i.e., compostos de fórmula (II) em que o substituinte é cicloalqueno ou cicloalquilo C_4-C_6 , facultativamente substituído pelo grupo alquilo C_1-C_4 ; 1-metiltioetilo, ou um grupo heterocíclico de oxigênio ou enxofre de 5 ou 6 membros, especialmente 3-tienilo ou 3-furilo.

A mutação de um membro produtor de avermectina da espécie Streptomyces avermitilis é efectuada de acordo com processos conhecidos utilizando-se qualquer um de uma série de agentes mutantes, incluindo radiação ultravioleta, radiação por raios-X, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, sulfonato de etilmetano, ácido nítrico e mustardas de azoto, por exemplo, N-metilbis(2-cloroetil)amina, ou tratamentos similares. A mutagénese pode ser conduzida com esporos ou numa cultura vegetativa de S. avermitilis capaz de produzir avermectinas naturais, por exemplo, S. avermitilis ATCC 31272.



Seguindo-se processos bem conhecidos dos técnicos da especialidade, seleccionam-se colónias mutadas com base num método de ensaio bioquímico que permite o rastreio de grande número de colónias bacterianas mutadas aleatoriamente para a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ácidos γ - ^{14}C -1_7-2-oxo (Tabor, et al., J. Bact. 128, 485-486, 1976).

A metodologia compreende o crescimento das colónias de mutante nas cavidades de uma lâmina de microtitulação num meio nutriente adequado, a permeabilização das células com tolueno seguida pela adição do ácido γ - ^{14}C -1_7-2-oxo (por exemplo, ácido 2-oxoisocaproico) a cada cavidade e análise da atmosfera sob fermentação relativamente a $^{14}\text{CO}_2$.

Alternativamente, o ácido γ - ^{14}C -1_7-2-oxo-3-metilvalérico, ou o ácido γ - ^{14}C -1_7-2-oxo-3-metilbutírico, pode ser utilizado em vez do ácido γ - ^{14}C -1_7-2-oxo-isocaproico. A produção de $^{14}\text{CO}_2$ é convenientemente verificada por colocação de um papel de filtro húmido saturado com $\text{Ba}(\text{OH})_2$ debaixo das cavidades individuais para detectar a libertação de qualquer quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ e a existência de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, se existir, por autoradiografia. Os mutantes que não apresentam actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada proporcionam autoradiogramas que se aproximam das dos controlos em branco; i.e., não é produzido nenhum $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ pelos mutantes.

Os mutantes assim obtidos são submetidos a mutagénesse adicional por utilização de quaisquer dos agentes mutantes atrás mencionados. As colónias mutadas são escolhidas pela sua capacidade de produzir agliconas de avermectina, quando cultivadas num meio adequado.



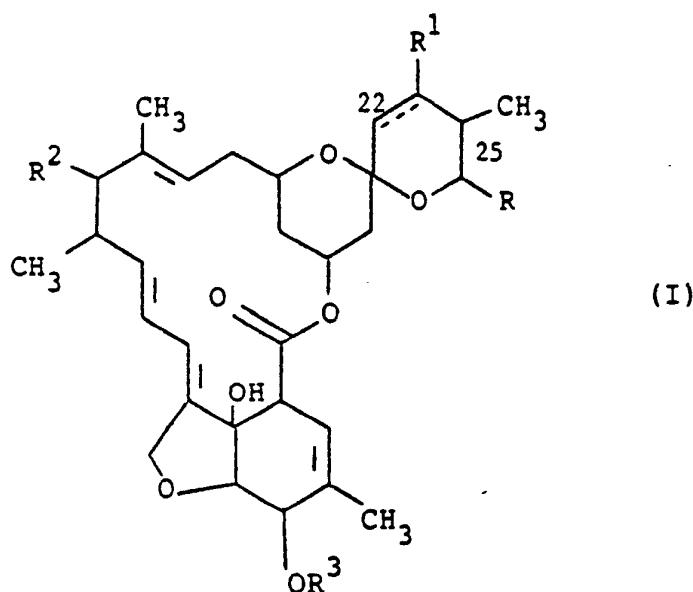
As características morfológicas e de cultura dos mutantes deste invento são geralmente conforme descrito na Patente Norte Americana 4.429.042, mas com algumas exceções. As características que distinguem os mutantes deste invento são a ausência de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada e a sua capacidade em produzir agliconas de avermectina quando cultivadas num meio adequado, como aqui descrito. Estas características resultam na não produção pelos mutantes das agliconas de avermectina naturais, quando desenvolvidos num meio definido practicamente livre de ácidos gordos RCOOH, em que R é isopropilo ou (S)-sec-butilo, ou compostos convertíveis no referido RCOOH durante a fermentação. A investigação taxonómica conduzida pela American Type Culture Collection confirmou que as características da S. avermitilis I-3, a estirpe mãe, ela própria um mutante (seleccionada do ensaio de $^{14}\text{CO}_2$ anterior), são muito próximas daquelas da estirpe ATCC 31272 avó descrita na Patente Norte Americana 4.429.042. Contudo, a estirpe mutante I-3 (ATCC 53567) forma muito menos cadeias de esporos do que a ATCC 31272; por outro lado, contrariamente à descrição dada por Merck para ATCC 31272, na Patente Norte Americana 4.429.042, não fomos capazes de detectar crescimento dos mutantes ou de ATCC 31272 com a sacarose, como única fonte de carbono.

O mutante I-3 é deficiente apenas na actividade de descarboxilase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada. O mutante S-2805 duplamente bloqueado, obtido por mais uma mutação de I-3, e seleccionado pela sua capacidade de produzir agliconas de avermectina suporta uma relação taxonómica com a ATCC 31272 semelhante à da estirpe mutante I-3.

A Streptomyces avermitilis I-3

e S-2805 foram depositadas sob os termos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, um depositório reconhecido que proporciona permanência aos depósitos e uma acessibilidade fàcial aos mesmos pelo público, desde que a patente tenha sido concedida a este pedido. Foi-lhes dada a designação de Streptomyces avermitilis ATCC 53556 e ATCC 53677, respectivamente. Os depósitos estão disponiveis durante o periodo de prioridade deste pedido a qualquer entidade autorizada para isso pelo Comissário do Gabinete de Marcas e Patentes dos Estados Unidos sob 37CFR 1.14 e 35 USC 122, e de acordo com as leis da patente estrangeira em paises onde os pedidos correspondentes a este, ou os seus resultantes, estão depositados. Todas as restrições de acesso pelo público aos microorganismos depositados serão irrevogavelmente levantadas após a concessão da patente.

Cada uma das S. avermitilis ATCC 31267, ATCC 31271, ATCC 31272 e NCIB 12121 produz as avermectinas naturais correspondentes aos compostos de fórmula (I)

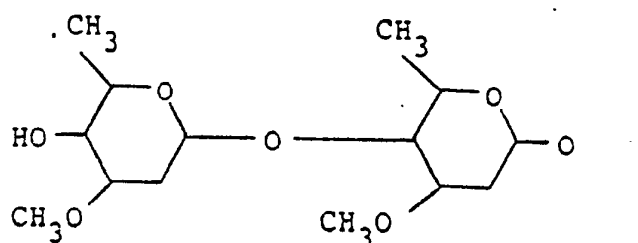




na qual a linha a tracejado na posição 22-23 representa uma ligação dupla facultativa;

R^1 é hidroxí e está presente apenas quando a ligação dupla está ausente;

R^2 é 4'-(alfa-L-oleandrosil)-alfa-L-oleandrosiloxi com a fórmula



R^3 é hidrogénio ou metilo; e

R é isopropilo ou (S)-sec-butilo. A Patente Norte Americana 4.285.963 descreve uma avermectina de fórmula (I) em que a posição-25 é substituída por um grupo metilo e etilo, R^1 é hidroxí e R^3 é metilo.

Nas avermectinas não-naturais aqui referidas, R é um substituinte diferente de isopropilo ou (S)-sec-butilo e é como definido a seguir.

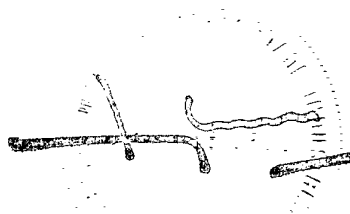
Os mutantes deste invento produzem agliconas de avermectina, fórmula (II); i.e. compostos de fórmula (I), mas em que R^2 é hidroxí. O valor de R nas agliconas de avermectina produzidas pelos mutantes deste



invento podem corresponder ao grupo (isopropilo ou (S)-sec-butilo) presente nas avermectinas naturais, ou a um grupo R em que R é um grupo, diferente de isopropilo ou (S)-sec-butilo, assimilável na posição 25 pelos mutantes aqui descritos.

Os compostos L-valina e L-isoleucina essenciais para a biossíntese de avermectinas naturais e das agliconas respectivas [fórmulas (I) e (II)] produzem-se na célula de S. avermitilis. Acredita-se que estes compostos entram na biossíntese das avermectinas através da conversão em ácido 2-oxo e da descarboxilação do ácido por desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada, concomitante com a ligação do produto ao coenzima A. A sua presença contribui para a produção simultânea de ambos os compostos isopropilo e (S)-sec-butilo de fórmulas (I) e (II). Isto, evidentemente, dá origem a problemas na separação do isopropilo dos derivados de (S)-sec-butilo.

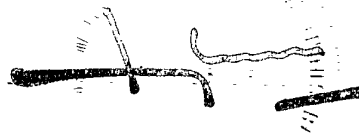
Quando fermentado num meio nutriente que contém o composto de partida apropriado, os mutantes deste invento produzem um composto de fórmula (II) ou, conforme for o caso mais corrente, uma mistura de dois ou mais compostos de fórmula (II) em que R corresponde ao composto de partida utilizado. Podem ser produzidos até quatro produtos, conveniente e trivialmente designados por A1 aglicona, R-avermectina, A2 aglicona, B1 aglicona e B2 aglicona. O grupo "-R" evidentemente, refere-se ao substituinte em C-25. Por exemplo, quando R é ciclopentilo, as quatro agliconas de avermectina possíveis são:



| <u>Nome Trivial</u> | <u>R¹</u> | <u>R³</u> |
|--|----------------------|----------------------|
| A1 Aglicona de avermectina de ciclopentilo | ligação dupla | CH ₃ |
| A2 aglicona de avermectina de ciclopentilo | hidroxi | CH ₃ |
| B1 aglicona de avermectina de ciclopentilo | ligação dupla | H |
| B2 aglicona de avermectina de ciclopentilo | hidroxi | H |

Na aglicona de avermectina não-natural, o substituinte "R" em C-25 é diferente de isopropilo ou de (S)-sec-butilo.

Os compostos de fórmula (II) onde a dupla ligação está presente e OH está ausente podem ser preparados alternativamente a partir do composto correspondente de fórmula (II) em que R¹ é OH e a ligação dupla está ausente, por meio de uma reacção de desidratação. A reacção é levada a cabo em primeiro lugar por protecção selectiva dos grupos hidroxi nas posições 5 e 13, por exemplo o derivado de acetilo de t-butildimetilsililoxi, depois por reacção com um haleto de tiocarbonilo substituído, tal como cloreto de (4-metilfenoxi)tiocarbonilo, seguida por aquecimento num solvente, de ponto de ebulição elevado, por exem-



plo triclorobenzeno, para efectuar a desidratação de acordo com os processos descritos na Patente dos Estados Unidos No. 4.328.335. O produto é finalmente desprotegido para produzir um composto insaturado.

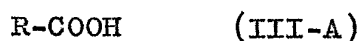
Os compostos de fórmula (II) em que R^3 é H podem também ser preparados a partir dos compostos correspondentes onde R^3 é CH_3 , por desmetilação. Esta reacção é alcançada por tratamento do composto 5-metoxi, ou de um seu derivado adequadamente protegido, com acetato mercúrico, e hidrolização do éter enólico de 3-acetoxi resultante com ácido diluído para produzir o composto 5-ceto. Este é então reduzido utilizando, por exemplo, boridreto de sódio para produzir o derivado 5-hidroxi. Os reagentes e as condições de reacção apropriadas para estas etapas são descritos na Patente Norte Americana No. 4.423.209.

Os compostos de fórmula (II), em que R^1 é H e a ligação dupla está ausente, podem ser preparados a partir do composto correspondente, no qual a ligação dupla está presente e R^1 está ausente, por hidrogenação catalítica, selectiva, utilizando-se um catalizador apropriado. Por exemplo, a redução pode ser obtida utilizando-se clireto de tris(trifenilfosfina)ródio (I), conforme está descrito na Publicação do Pedido de Patente Europeia No. 0001689.

As agliconas, fórmula (II), podem ser também preparadas a partir dos compostos de fórmula (I) correspondentes (R^2 é 4'-(alfa-L-oleandrosil)-alfa-L-oleandrosiloxi) por remoção do grupo 4'-(alfa-L-oleandrosil)-alfa-L-oleandrose por hidrólise suave com um ácido num solvente orgânico aquoso para produzir a aglicona que possui um grupo hidroxi na posição 13.



Os compostos capazes de ser utilizados pela S. avermitilis deste invento para a biossíntese de avermectinas, naturais ou não-naturais, são compostos de fórmula (III-A)



incluindo os compostos convertíveis nos (III-A) durante o processo de fermentação. Estes compostos são designados aqui por "compostos primários". Na fórmula (III-A), R é um grupo alfa de cadeia ramificada, em que o átomo de carbono ao qual está ligado o grupo -COOH está também ligado a pelo menos dois outros átomos ou grupos diferentes de hidrogénio. Esta definição abrange, evidentemente, os grupos acíclicos e cíclicos saturados e insaturados, incluindo aqueles que suportam facultativamente um heteroátomo de enxofre ou de oxigénio como um membro da cadeia acíclica ou do anel cíclico.

Mais especificamente, R, que se torna o substituinte em C-25, pode ser um grupo alfa alquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$ ramificado, alquenilo, alquinilo, alcóxialquilo ou alquiltioalquilo; um grupo cicloalquilalquilo $\text{C}_5\text{-C}_8$ em que o grupo alquilo é um grupo alfa alquilo $\text{C}_2\text{-C}_5$ ramificado; um grupo cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$ ou cicloalquenilo $\text{C}_5\text{-C}_8$, em que qualquer um deles pode ser facultativamente substituído por metileno, ou por um ou mais grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, ou por átomos halo (flúor, cloro, iodo ou bromo); ou um anel heterocíclico contendo oxigénio ou enxofre de 3 a 6 membros, o qual pode ser saturado, ou total ou parcialmente insaturado e pode ser facultativamente substituído por um ou mais grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ ou átomos halo.

Os compostos convertíveis em



RCOOH (III-A); i.e., precursores, no processo de fermentação, são compostos de fórmulas (III-B), onde R é como definido anteriormente:



n é 0, 2, 4 ou 6; e Z é $-CH_2OH$, $-CHO$, $-CHO$, $-CH_2NH_2$, $-COOR^5$ ou $-CONHR^6$, em que R^5 é H ou alquilo (C_{1-6}); R^6 é hidrogénio, alquilo- (C_{1-4}) , ou o residuo de um amino ácido especialmente de ácido aspártico, ácido glutâmico e metionina, por exemplo, $-CH(COOH)CH_2COOH$, $-CH(COOH)(CH_2)_2COOH$ e $-CH(COOH)(CH_2)_2SCH_3$, respectivamente.

Também incluídos neste invento, estão as formas isoméricas dos compostos de fórmula (III-A) e (III-B) e de compostos convertíveis nos mesmos durante o processo de fermentação, resultando as agliconas de avermectina isoméricas em C-25 da sua utilização no processo aqui descrito.

O processo deste invento é realizado por fermentação aeróbica com uma estirpe de S. avermitilis que não tem a capacidade de produzir avermectinas glicosiladas nem a actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada, num meio nutriente aquoso compreendendo uma fonte assimilável de azoto, carbono, sais inorgânicos e um composto de fórmula RCOOH, ou um composto convertível no referido composto (i.e., um precursor) durante a fermentação. O ácido, ou o composto convertível no mesmo, é adicionado à fermentação, ou na altura da inoculação, ou em intervalos durante a fermentação. A produção dos produtos de aglicona de avermectina pode ser controlada por remoção de amostras da fermentação, por extracção com um solvente orgânico e por detecção do aparecimento do produto por cromatografia, por exemplo utilizando-se cromatografia.

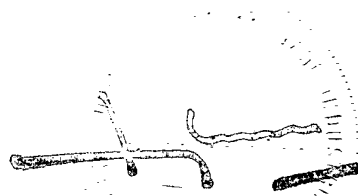


tografia líquida de alto rendimento. A incubação é continuada até a produção de produto ter sido maximizada, geralmente durante um período de 4 a 15 dias.

Um nível preferido para cada adição dos compostos primários (ácido carboxílico ou um composto convertível no mesmo) varia entre 0,05 e 3,0 gramas por litro. O composto primário pode ser adicionado ou continuamente, ou intermitentemente, ou todo de uma vez à fermentação. O ácido (RCOOH) é adicionado como tal ou na forma de um sal, tal como o sal de sódio, de lítio ou de amónio, ou como um composto convertível no ácido, conforme definido anteriormente. O ácido, se sólido é preferivelmente dissolvido num solvente adequado tal como água ou alcoois (C_{1-4}).

Os meios utilizados para a fermentação podem, ser especialmente quando o substituinte em C-25 é isopropilo ou (S)-sec-butilo, meios convencionais contendo fontes assimiláveis de carbono, azoto e elementos vestigiais. Quando o substituinte em C-25 é um grupo não-natural (i.e. não é isopropilo ou (S)-sec-butilo), o meio de fermentação será um em que os ingredientes escolhidos não possuem, ou contém apenas quantidades mínimas de compostos primários, onde a metade R é isopropilo ou (S)-sec-butilo.

Após fermentação durante um período de vários dias a uma temperatura preferivelmente entre 24 e 33°C , o caldo de fermentação é centrifugado ou filtrado e o bolo micelial é extraído com, preferivelmente acetona ou metanol. O extracto de solvente é concentrado e o produto desejado é então extraído num solvente orgânico imiscível em água, tal como cloreto de metileno, acetato de etilo, cloroformio, butanol ou cetona de isobutilo de metilo. O extracto de solvente é concentrado e o produto



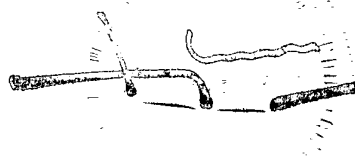
em bruto é purificado adicionalmente, se necessário, por cromatografia por exemplo cromatografia líquida de alto rendimento, de fase inversa, preparativa.

O produto é geralmente obtido como uma mistura dos compostos de fórmula (II), na qual R^1 é OH e a ligação dupla está ausente, ou R^1 está ausente e a ligação dupla está presente e em que R^3 é H ou CH_3 ; contudo, as proporções podem variar dependendo do mutante particular e do composto de partida empregues e das condições utilizadas.

A fonte do grupo R; i.e., quer venha directamente de R-COOH quer seja produzida a partir de um dos precursores anteriores, quer a partir de qualquer precursor, é irrelevante para a produção das agliconas de avermectina. O requisito crítico do processo deste invento para a sua produção é a de o grupo R desejado ser proporcionado às estirpes S. avermitilis deste invento no processo de fermentação.

Os compostos adequados incluem os seguintes:

ácido 2,3-dimetilbutírico
 ácido 2-metilhexanóico
 ácido 2-metilpent-4-enóico
 ácido 2-ciclopropil propiónico
 sal de lítio de ácido 4,4-difluorociclohexano carboxílico
 ácido 4-metilenociclohexano carboxílico
 ácido 3-metilciclohexano carboxílico (cis/trans)
 ácido 1-ciclopenteno carboxílico
 ácido 1-ciclohexeno carboxílico
 ácido tetrahidropiran-4-carboxílico
 ácido tiofeno-2-carboxílico
 ácido 3-furóico



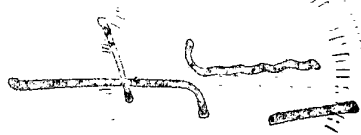
ácido 2-clorotiofeno-4-carboxílico
 ácido ciclobutano carboxílico
 ácido ciclopentano carboxílico
 ácido ciclohexano carboxílico
 ácido cicloheptano carboxílico
 ácido 2-metilciclopropano carboxílico
 ácido 3-ciclohexeno-1-carboxílico
 ácido 2-metiltiopropiónico
 ácido 2-metil-4-metoxibutírico
 ácido tiofeno-3-carboxílico
 hidroximetilciclopentano
 3-tiofeno carboxaldeído
 ácido 3-ciclohexilpropiónico
 ácido 3-ciclopentilpropiónico
 hidroximetilciclobutano
 ácido tetraidrotiofeno-3-carboxílico
 3-ciclopentil-1-propanol
 sal de litio de ácido 3-metilciclobutano carboxílico
 ácido 3-fluorociclobutano carboxílico
 sal de litio de ácido 3-metilenociclobutano carboxílico
 ácido 2-metil-4-metiltiobutírico
 ácido tetraidrotiopirano-4-carboxílico
 ciclobutilmetilamina
 ciclobutanocarboxilato de etilo
 4-hidroximetilciclopenteno
 éster etílico de ácido 2-(3-tiofenocarbonil)propiónico
 ácido S-2-metilpentanóico
 ácido R-2-metilpentanóico.

Os mutantes de O-metiltransfera-
 se podem ser obtidos a partir dos mutantes produtores de
 aglicona negativa de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia
 ramificada aqui descritos. As mutações da actividade de
 desidrogenase de ácido 2-oxo activo de cadeia ramificada,

combinadas com uma mutação de O-metil-transferase, produzem estirpes de S. avermitilis que, quando alimentadas a compostos RCOOH, ou a compostos convertíveis em RCOOH durante o processo de fermentação, produzirão principalmente avermectinas B. Estes mutantes são obtidos por mutagênese dos mutantes aqui descritos com ausência de actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada por meio de luz ultravioleta e/ou mutagêneos químicos tais como N-metil-N-nitrosouretano, nitrosoguanidina ou outros agentes tais como aqueles enumerados anteriormente. Alternativamente, os mutantes positivos de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada que não possuem a O-metiltransferase podem ser transformados por mutação por meio de tratamento com luz ultravioleta, ou com um agente mutante para produzir os mutantes produtores de aglicona negativa de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada.

Para além da produção dos alelos desejados de uma determinada estirpe de um microorganismo por mutagênese, a fusão de protoplastos permite a introdução de alelos desejáveis produzidos/identificados numa estirpe no cromossoma de uma outra estirpe. Por exemplo, uma estirpe de S. avermitilis com uma actividade de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada deficiente e também com uma capacidade deficiente de glicosilar avermectinas pode, por fusão de protoplastos com uma estirpe de S. avermitilis deficiente em 5-O-metiltransferase produzir uma estirpe de S. avermitilis capaz de sintetizar apenas agliconas de avermectinas B.

As agliconas de avermectinas não-naturais produzidas por tais mutantes são caracterizadas pela presença de grupos hidroxí na posição C-5 da metade de aglicona.

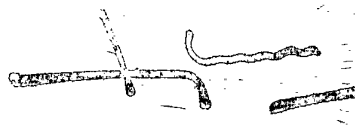


Os mutantes atrás descritos são identificadas de acordo com a metodologia descrita por Schulman et al., Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia 29, 620-624 (1986). Eles têm utilidade para os mesmos fins e da mesma forma que o têm as agliconas de avermectinas conhecidas.

Alternativamente, as maiores quantidades das avermectinas B são produzidas por fermentação dos mutantes deste invento, que não possuem desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada, na presença de uma substância tal como sinefungina, S-adenosiletionina ou S-adesilhomocisteína que apresente actividade de O-metil transferase.

Os compostos do invento são agentes antiparasiticas fortemente activos que possuem utilidade particular como antelminticos, ectoparasiticidas, insecticidas e acaricidas.

Deste modo, os compostos são eficazes no controlo, i.e., prevenção e tratamento, de uma variedade de doenças causadas por endoparasitas, incluindo em particular, helmintíase que é mais frequentemente causada por um grupo de vermes parasitas descritos como nematodes e que podem causar graves perdas económicas em suínos, carneiros, cavalos e gado, bem como afectar animais e aves domésticas. Os compostos são também eficazes contra outros nematodes que afectam várias espécies de mamíferos (humanos e animais) incluindo, por exemplo, Dirofilaria em cães e vários parasitas que podem infectar seres humanos incluindo parasitas gastro-intestinais tais como Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Capillaria, Trichuris, Enterobius e parasitas que podem ser encontrados no sangue ou noutros tecidos ou órgãos, tais como vermes filariais e os estados do extracto intestinal de Strongyloides e Tri-



chinella.

Os compostos são também importantes para o tratamento de infecções ectoparasitárias incluindo em particular ectoparasitas artrópodes de animais e pássaros tais como carrapatos, ácaros, piolhos, pulgas, moscas-varejeiras, insectos mordedores e larvas migradoras dípteras que podem afectar o gado e os cavalos.

Os compostos são também insecticidas activos contra pragas domésticas tais como baratas, traças da roupa, escaravelhos de carpetes e moscas assim como são úteis contra as pragas de insectos de grãos armazenados e de plantas agrícolas tais como ácaros aranha, afídeos, lagartas, ortópteros migratórios tais como gafanhotos.

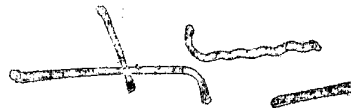
Os compostos de fórmula (II) são administrados como uma formulação apropriada para a utilização específica em questão, para a espécie particular do animal hospedeiro a tratar e para o parasita ou insecto envolvido. Para utilização como um antelmintico, os compostos podem ser administrados oralmente na forma de uma cápsula, pilula grande, comprimido ou uma poção líquida, ou alternativamente, eles podem ser administrados por injeção ou como um implante. Estas formulações são preparadas de uma maneira convencional de acordo com a prática veterinária corrente. Deste modo, as cápsulas, as pilulas grandes ou os comprimidos podem ser preparados por mistura do ingrediente activo com um diluente ou veículo finamente dividido adequado que contem adicionalmente um agente desintegrante e/ou ligante tal como amido, lactose, talco, estearato de magnésio, etc. Uma formulação para poção pode ser preparada por dispersão do ingrediente activo numa solução aquosa, conjuntamente com agentes dispersantes ou humidificantes, etc., e as formulações injectáveis podem ser preparadas na forma de uma solução esterilizada que pode conter outras substâncias,



por exemplo, sais ou glucose em quantidade suficiente para tornar a solução isotónica com o sangue. Estas formulações variam de acordo com o peso do composto activo, dependendo das espécies do animal hospedeiro a ser tratado, com a gravidade e tipo da infecção e com o peso corporal do hospedeiro. Geralmente, para administração oral, é satisfatória uma dose de cerca de 0,02 a 10 mg por kg de peso corporal do animal, dada como uma dose individual em doses divididas, durante um periodo desde cerca de 1 a 5 dias, mas, evidentemente, podem haver casos onde são indicadas gamas de dosagem superiores ou inferiores, e estas estão dentro do âmbito deste invento.

Como uma alternativa, os compostos podem ser administrados com a ração do animal e para este fim pode-se preparar um aditivo ou uma pré-mistura alimentar concentrada para mistura com a alimentação normal do animal.

Para utilização como um insecticida e para o tratamento de pragas agricolas, os compostos são aplicados como pulverizações, pós, emulsões, etc., de acordo com a prática agricola corrente.



Produção de S. avermitilis I-3 (ATCC 53567):

Etapa 1 S. avermitilis ATCC 31272 foi desenvolvida como uma relva confluenta sobre New Patch Agar Medium durante 12 dias a 30°C. O meio compreendia:

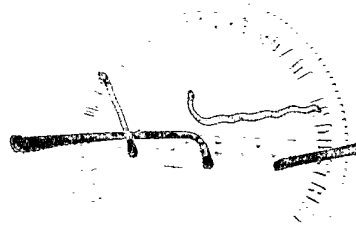
| | |
|------------------------------------|--------------|
| Sumo V-8* | 200 ml |
| CaCO ₃ | 3 gramas |
| Agar | 15 gramas |
| H ₂ O até | 1000 ml |
| Caldo de nutriente | 1,0 gramas/L |
| Acetato de sódio.3H ₂ O | 1,4 gramas/L |
| Ácido isovalérico | 50 mg/L |
| Ácido isobutírico | 50 mg/L |
| Ácido 2-metilbutírico | 50 mg/L |
| Isoleucina | 250 mg/L |
| Leucina | 250 mg/L |
| Valina | 250 mg/L |
| Solução de elementos vestigiais* * | 1 ml/L |

*

Uma mistura de 8 sumos vegetais (tomate, cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre) mais sal, ácidos ascórbico e cítrico e aromas naturais. Adquirível na Campbell Soup Company, Camden, NJ.

* *

Composição de solução de elementos vestigiais:

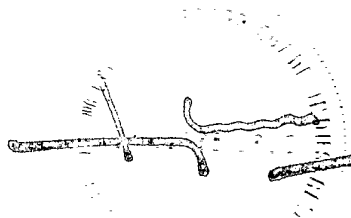


| | |
|---|-------|
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 2,7 g |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4,2 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 |
| CaCl_2 | 11,0 |
| H_3BO_3 | 0,60 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,24 |
| ZnCl_2 | 0,68 |
| Na_2MoO_4 | 0,24 |

Dissolver o anterior em 1 litro de HCl 0,1N.

Os esporos foram recolhidos de 3 lâminas e foram suspensos em 20 ml de tampão de ácido tris-maleico em 0,05M, pH 9,0.

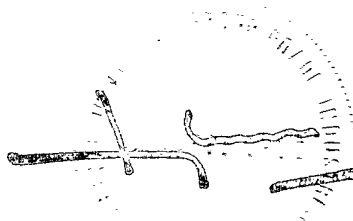
Etapa 2: 10 ml da suspensão de esporos foram adicionados a um frasco contendo 10 mg de N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (NTG). O frasco foi incubado e agitado a 28°C durante 60 minutos e os esporos foram então lavados profundamente com uma solução de NaCl a 1%.



Etapa 3: Os esporos lavados foram suspensos em NaCl a 1% e misturados com um volume igual de etileno glicol a 80%. Esta suspensão foi conservada a -20°C e utilizada como uma fonte de células para serem separadas dos mutantes. Obtiveram-se aproximadamente 10^4 colónias/ml quando germinadas.

Esta colónia de esporos foi espalhada sobre lâminas YPD para produzir aproximadamente 100 colónias por placa (o meio YPD compreende 10 g/l de cada um de extracto de levedura, Bacto peptona*, e dextrose; e 15 g/l de Bacto agar*, ajustado para pH 6,9 antes de ser submetido a autoclave). Os ingredientes assinalados com um asterisco podem ser adquiridos nos Laboratórios Difco, Detroit, Michigan 48238.

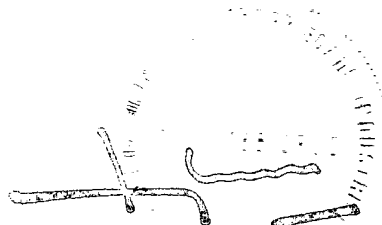
Etapa 4: Recolheram-se colónias individuais das lâminas ao fim de 2-3 semanas de desenvolvimento a 28°C e estas foram colocadas em cavidades individuais de uma lâmina de microtitulação normal de 96 cavidades. Igualmente, uma pequena quantidade da colónia foi colocada sobre um meio de ágar fresco para servir como fonte de células viáveis, quando os mutantes são identificados.



Etapa 5: A cada cavidade adicionaram-se aproximadamente 75 microlitros de um meio de sais M9 liquido contendo 1% de glucose, 0,1% de casamino-ácidos e 0,01% de cada um dos ácidos isovalérico, isobutirico e 2-metilbutirico. Após vários dias de incubação a 28°C, as células foram analisadas para determinação da presença de desidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada. (Cada litro de meio de sais M9 compreende 6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl e 1 g de NH_4Cl . O meio é submetido a autoclave e depois adiciona-se assepticamente 1 ml de cada um de MgSO_4 1M e CaCl_2 0,1 M esterilizado).

Etapa 6: Preparou-se uma microcrossuspensão de 5% de tolueno num meio de sais M9 por sonicação breve da mistura imiscível. A 25 ml desta suspensão adicionaram-se 1,2 ml de uma solução contendo ácido $[-^{14}\text{C}-1_7-2\text{-oxo-isocaproico}]$, 2,5 microcurie/ml e 10,0 microcurie/micromole. Adicionaram-se 50 microlitros desta mistura total a cada uma das cavidades das lâminas de microtitulação que contêm as colónias a serem ensaiadas.

Etapa 7: O $^{14}\text{CO}_2$ produzido a partir de cada lâmina foi recolhido e visualizado pelo processo descrito por Tabor et al., J. Bacteriol. 128 485-486 (1976) designado por "Método Cómodo para Detecção de $^{14}\text{CO}_2$ em Amostras Múltiplas: Aplicação ao rastreio rápido de Mutantes". Os mutantes que não possuem desidrogenase activa de ácido 2-oxo de cadeia ramificada não produzem qualquer quantidade de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ para além da observada nos controlos.



Um método mais refinado que melhora o contraste entre um ensaio positivo relativamente a $^{14}\text{CO}_2$, indicado pela mancha negra no autoradiograma como resultado da formação de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, e um ensaio negativo indicado por ausência de mancha ou uma mancha muito suave, compreende o seguinte processo de separação modificado.

Recolheram-se colónias individuais (ver Etapa 4 anterior) do meio de agar depois de 7-14 dias de crescimento (em vez de 2-3 semanas e ensaiadas directamente pelas etapas 6 e 7 anteriores). A etapa 5 do processo anterior foi omitida.

Um método de ensaio ainda mais refinado que é quantitativo em natureza relativamente à libertação de $^{14}\text{CO}_2$ compreende o crescimento dos mutantes detectados pelos processos de separação anteriores num meio adequado que compreende um meio de saís M9 com glucose 1% e "Syncasa-bcaa", 0,1% (uma mistura sintética de L-amino ácidos com a composição aproximada dos casamino-ácidos comerciais, mas sem a presença de L-valina, L-isoleucina e L-leucina, ver atrás).

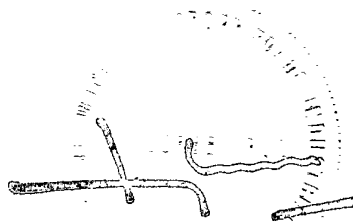


Composição de "Syncasa-bcaa", Concentrado 100 vezes

| | <u>gramas/litro</u> |
|-------------------|---------------------|
| L-alanina | 3 |
| L-arginina | 4 |
| Ácido L-aspartico | 6 |
| L-cistina | 1 |
| Ácido L-glutâmico | 20 |
| glicina | 1 |
| L-histidina | 2 |
| L-lisina | 7 |
| L-metionina | 3 |
| L-fenilalanina | 6 |
| L-prolina | 10 |
| L-serina | 6 |
| L-treonina | 4 |
| L-tirosina | 4 |
| L-triptofano | 1 |

A mistura é ajustada para pH 7 e o filtro é esterilizado. Adiciona-se um volume de concentrado a 99 volumes de meio para se obterem concentrações de utilização correntes.

Depois de se terem desenvolvido até uma densidade celular elevada, as células foram lavadas num meio de sais M9 e ressuspensas num meio frio de sais M9 contendo 1% de tolueno que foi sonicado para produzir uma dispersão branca leitosa de tolueno. A suspensão célula/tampão/tolueno foi incubada durante 40 minutos a 30°C a fim de permeabilizar as células. As células permeabilizadas foram então lavadas num meio de sais M9 e finalmente ressuspensas em um quinto de volume primitivo de tampão de meio M9. Utilizaram-se 180 microlitros desta suspensão por



ensaio.

Um volume de reacção de 300 microlitros continha as células toluenizadas, pirofosfato de tiamina (PFT), 0,4 ml; coenzima A (CoA), 0,11 mM; dinucleotido de adenina de nicotinamida (NAD), 0,68 mM, ditiotreitól (DTT), 2,6 mM; $MgCl_2$, 4,1 mM; Tris-HCl, 60 mM; Tris-HCl, 60 mM, pH 7,5; e γ - ^{14}C -1_7-alfa-cetoisocaproato, 6.000 cpm, microcurie por micromole. A eficiência de contagem foi de 73%. A reacção foi efectuada em 15 ml de frascos de cintilação contendo quadrados de papel Whatman #4 de 2 x 2 cm comprimido na cápsula # roscada do frasco.

O papel contem 30 microlitros de Hidróxido de Hiamina (solução 1M de hidróxido de metilbenzetónio em metanol; adquirível na Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178), que capta o $^{14}CO_2$ libertado. Após incubação durante 2 horas, as papeis são imersos em 10 ml de Beckman Aquasol II (Universal LSC (contador de cintilação líquido) adquirível na New England Nuclear Research Products, Boston, MA 02118) e a radioactividade é medida num contador de cintilação líquido após equilibrio neste solvente durante 4 horas ou mais. Uma reacção de controlo em branco (i.e. - sem células) proporciona cerca de 50-300 cpm.

Os mutantes I-3 e outros do mesmo tipo proporcionaram contagens inferiores ou iguais às da reacção de controlo em branco, ao passo que a estirpe mãe proporcionou contagens várias vezes superiores ao valor de controlo em branco.



Isolamento de S. avermitilis S-2805 (ATCC 53677)

Etapa 1: Aproximadamente 100 mg de S. avermitilis I-3 (ATCC 53567), desenvolvidos sobre uma lâmina de agar SAMM fresco durante quatro dias, foram inoculados dentro de um frasco de 300 ml contendo 50 ml de meio SCM (pH 7,2). O frasco foi então agitado a 200 rpm e a 30°C durante vinte e quatro horas (pH final = 8,2).

Etapa 2: O frasco foi retirado do agitador e centrifugaram-se 10 ml de todo o caldo num tubo esterilizado durante cinco minutos a 2000 rpm. As células foram então ressuspensas em 50 ml de meio SCM em frascos Erlenmeyer de 300 ml esterilizados e os frascos foram agitados num agitador rotativo durante 2 horas a 30°C.

Etapa 3: Os 10 ml da suspensão foram colocados num tubo esterilizados.

Etapa 4: Adicionou-se sulfonato de etilmetano ao tubo (numa cobertura bem ventilada), os conteúdos são completamente misturados, depois deitados num frasco de 300 ml esterilizados e este é agitado num agitador rotativo durante três horas a 30°C.

Etapa 5: Adicionou-se meio SCM esterilizado fresco (40 ml) ao frasco e a agitação continuou durante um total de 70 horas a 30°C.

Etapa 6: O frasco foi removido, os conteúdos foram agitados a 8000 rpm durante 10 minutos a 20°C. As células foram lavadas por re-suspensão num meio SCM, agitadas novamente e re-suspensas em 10 ml de meio SCM.

MEIO SCM

| | |
|--|---------|
| Autolisato de levedura | 10 g/l |
| Extracto de carne | 5 g/l |
| Hidrolisato enzimático de caseína | 10 g/l |
| MgSO ₄ 1M | 3 g/l |
| K ₂ HPO ₄ 1M; pH 7,0 (HCl) | 100 g/l |

Etapa 7: A população mutada é diluída e espalhada por colónias individuais sobre agar SAMM.

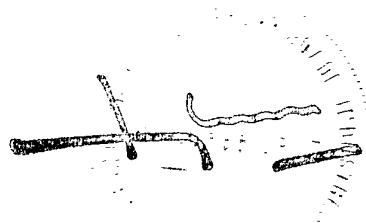


Agar SAMM

| | <u>g/L</u> |
|---------------------------|------------|
| Na_2HPO_4 | 6,0 |
| KH_2PO_4 | 3,0 |
| NaCl | 0,5 |
| NH_4Cl | 1,0 |
| 1M MgSO_4 | 1,0 |
| CaCl_2 0,1M | 1,0 |
| Dextrose | 8,0 |
| Casamino Ácidos | 20,0 |
| Agar | 20,0 |

Etapa 8: As colónias da população mutada (sulfonato de etilmetano a 3%) da estirpe I-3 Streptomyces avermitilis (ATCC 53567) são recolhidas e espalhadas como emplastros sobre um meio de agar preparado como se segue (gramas por litro): amido diluído, 80; K_2HPO_4 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; ardamina PH, 5; CaCO_3 , 5; P-2000, 1 ml; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001; agar Bacto, 17; H_2O destilado para perfazer 980 ml. O pH é ajustado para 7,0 com NaOH antes de ser submetido a autoclave a 121°C durante 20 minutos. Após terem sido submetidos a autoclave, adicionam-se 20 ml de uma solução armazenada a 5% esterilizada de ácido (+)-2-metilbutírico, pH 7,0.

As culturas de agar são incubadas durante 8 a 12 dias a 28°C. As células (micélios) são retiradas da superfície do agar e colocadas em 250 microlitros de acetona. Vinte e cinco (25) microlitros dos extractos de acetona são então aplicados sobre lâminas de cromatografia



de camada fina pre-revestidas com Silica Gel GF Analtech. O cromatograma foi efectuado durante 30 a 40 minutos com acetato de etilo como solvente, depois seco e pulverizado com 3% de vanilina em etanol. As lâminas são colocadas num forno a 100°C durante 1 a 3 minutos, depois pulverizadas com ácido sulfurico a 3% em etanol e novamente colocadas num forno a 100°C durante 10 a 15 minutos. As culturas produtoras de aglicona são identificadas pelo aparecimento de uma nova mancha (R_f ca. 0,63). Esta migra para ficar coincidente com a aglicona A2 preparada por hidrólise ácida de A2a (H_2SO_4 a 1% em metanol, 25°C, 18 horas).

EXEMPLOS 1-5

Um frasco congelado da cultura S. avermitilis S-2805 (ATCC) foi inoculado em 100 ml de meio AS-7 num frasco de 500 ml triplamente tamponado. O frasco foi incubado num agitador rotativo com agitação a 200 rpm, a 28-30°C. Após 24 horas de incubação, inoculou-se 1 ml de caldo total em frascos de 300 ml contendo 40 ml de meio AP-5.

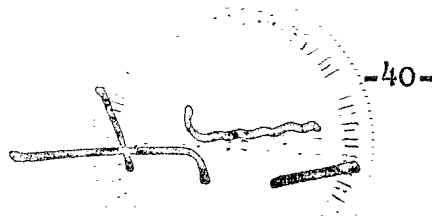
Efectuaram-se fermentações de 40 ml de em duplicado a 28-30°C na presença de 440 ppm de cada um dos compostos primários listados a seguir. A altura de adição dos compostos primários ($RCOOH$) à fermentação está indicada na coluna da direita.

Composto PrimárioAltura de Adição

| | |
|--------------------------------------|----------|
| ácido carboxílico de ciclohexano | 24 horas |
| ácido carboxílico de ciclopentano | 96 horas |
| ácido carboxílico de 3-tiofeno | 96 horas |
| ácido 2-metiltiopropiónico | 24 horas |
| ácido 2-metilbutirico | 96 horas |

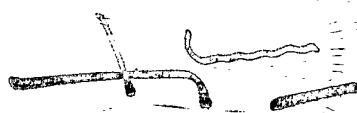
Após 26^h horas, as amostras de todo o caldo foram diluídas com água (10 mls) e extraídas com cloreto de metileno (2 x 20 mls). O extracto orgânico foi seco (MgSO_4) e evaporado até à secura. Os resíduos resultantes foram dissolvidos em metanol (1 ml) e 30 μl de solução foram injectados a uma coluna ODS de Ultrasphere Beckman (3,9 250 mm). A coluna foi eluída com uma mistura de metanol e com acetato de amónio 0,1M (85:15) a uma taxa de escoamento de 1 ml por minuto. O efluente da coluna foi passado directamente para um espectrómetro de massa de ter-
mopulverização VG 12 -250.

| Aglicona de Avermectina | Tempo de Retenção | Identidade do Compo- nente | Peso Molecular Calculado | Iões característicos (m/e) |
|----------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|
| sec-butilo | 5,69 | B2a | 602 | 603 (MH ⁺), 602 (M ⁺), 585 (MH ⁺ -H ₂ O), 567 (MH ⁺ -2H ₂ O) |
| sec-butilo | 6,56 | A2a | 616 | 634 (MNH ₃ ⁺), 617 (MH ⁺), 616 (M ⁺), 599 (MH ⁺ -H ₂ O), 581 (MH ⁺ -2H ₂ O) |
| sec-butilo | 8,39 | B1a | 584 | 585 (MH ⁺), 567 (MH ⁺ -H ₂ O) |
| sec-butilo | 10,08 | A1a | 598 | 617 (MNH ₃ ⁺), 599 (MH ⁺), 581 (MH ⁺ -H ₂ O) |
| ciclopentilo | 7,62 | 25-ciclopentilo, A2 | 628 | 646 (MNH ₃ ⁺), 629 (MH ⁺), 628 (M ⁺), 611 (MH ⁺ -H ₂ O), 593 (MH ⁺ -2H ₂ O) |



| Aglicona de Avermectina | Tempo de Retenção | Identidade do Compo- nente | Peso Molecu- lar Calcula- do | Iões característicos (m/e) |
|----------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|---|
| ciclopentilo | 12,36 | 25-ciclopentilo A1 | 610 | 628 (MNH ₃ ⁺), 611 (MH ⁺), 593 (MH ⁺ -H ₂ O) |
| 3-tienilo | 5,43 | 25 (3-Tienilo) A2 | 642 | 660 (MNH ₃ ⁺), 643 (MH ⁺), 642 (M ⁺), 625 (MH ⁺ -H ₂ O) |
| 3-tienilo | 7,79 | 25 (3-Tienilo) A1 | 624 | 642 (MNH ₃ ⁺), 625 (MH ⁺), 607 (MH ⁺ -H ₂ O) |

11



MEIO AS-7

| | <u>g/l</u> |
|----------------------------|------------|
| Amido diluido ^a | 20 |
| Ardamina pH ^b | 5 |
| Pharmamedia | 15 |
| CaCO ₃ | 2 |

a

Preparado por hidrólise de amido por alfa-amilase a partir de Bacillus licheniformis (adquirível na Novo Enzyme Wilton, CT e vendido sob a marca comercial "Termamyl") até um equivalente de dextrose de 40% + 5%

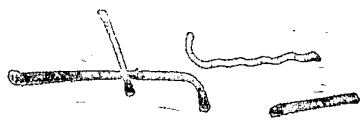
b

A partir de Yeast Products, Inc., Clifton, NJ 07012.

c

A partir de Traders Protein, Memphis, TN 38108.

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH a 25%.



Meio AP-5

| | <u>g/l</u> |
|--------------------------------------|------------|
| Amido diluido ^a | 80 |
| Ardamina pH ^b | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 |
| NaCl | 1 |
| CaCO ₃ | 7 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 |
| MnCl ₂ ·7H ₂ O | 0,001 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,001 |
| P-2000 (antiespumante) | 1 ml/l |

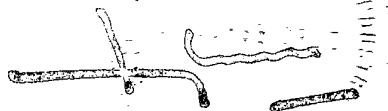
Ajustar o pH para 6,9 com NaOH a 25%.

EXEMPLO 6

Aglicona de 25-ciclopentilavermectina A2

Um inóculo congelado (2 ml) de uma cultura de um organismo ATCC 53677 de mutante Streptomyces avermitilis foi inoculado em 50 ml de um meio que continha amido (1 g), Pharmamedia (Marca Registrada) (0,75 g) ardamina pH (0,25 g), e carbonato de cálcio (0,1 g) num frasco de 300 ml e foi incubado a 28°C durante 2 dias. Este inóculo (50 ml) foi transferido para um segundo frasco de inóculo (600 ml) que continha amido (12 g), Pharmamedia (8 g), ardamina pH (3 g) e carbonato de cálcio (1,2 g) e foi incubado a 28°C durante mais 2 dias. Este inóculo foi utilizado para inocular 15 litros de um meio que continha amido (1,5 kg), sulfato de magnésio (15 g), Pharmamedia (75 g), hidrogenofosfato de dipotássio (15 g), sulfato ferroso (0,12 g), carbonato de cálcio (105 g), ácido glutâmico (9 g), sulfato de zinco (0,015 g) e sulfato manganoso (0,015 g) contido num frasco fermentador de 15 litros. A fermentação foi incubada a 28°C, com agitação a 350 rpm e arejamento de 15 litros por minuto. Adicionou-se ácido carboxílico (6 g) após 96 horas e novamente após 216 horas (6 g). Após 240 horas, o micélio foi removido por filtração e extraído com acetona (5 L + 0,75 L de lavagem). O extracto de acetona foi concentrado para aproximadamente 1,5 L e foi extraído com acetato de etilo (3 L) em duas porções. As camadas de acetato de etilo resultantes foram combinadas e evaporadas para produzirem um óleo castanho (1,2 g).

O óleo anterior foi dissolvido e éter dietílico e adicionado a uma coluna de silica gel (40 g). A coluna foi eluída com éter dietílico e recolheram-se 15 ml de fracções. As fracções 4-6 foram combinadas e



depois evaporadas para produzirem um material parcialmente purificado (135 mg). O produto foi dissolvido em metanol (0,5 ml) e foi cromatografado numa coluna (21 mm x 25 cm) C18 Zorbax ODS (Marca registada, Dupont), tendo-se eluido com uma mistura de metanol e água (75:25) a um caudal de 9 ml por minuto. As fracções importantes foram combinadas e o solvente foi evaporado para produzir o composto de fórmula (I) na qual R^1 é OH, a dupla ligação está ausente, R^2 é ciclopentilo, R^3 é CH e R^4 é OH sob a forma de um pó branco (9 mg) p.f. 131-133°C.

A estrutura do produto foi confirmada por espectrometria de massa da maneira que se segue:

A espectrometria de massa de bombardeamento atómico de alta velocidade foi levada a cabo num espectrómetro de massa VG Modelo 7070E, utilizando-se uma matriz de amostra de trietileno glicol com cloreto de sódio sólido. $(M + Na)^+$ observado a m/e 651 (teórico 651).

A espectrometria de massa de impacto de electrões foi levada a cabo, utilizando-se um espectrómetro de massa VG Modelo 7070F. Os valores para os fragmentos principais foram: 628 (M^+), 610, 468, 335, 317, 275, 251, 233, 223, 179.

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a preparação de agliconas de avermectina caracterizado por compreender a fermentação aeróbica de uma estirpe de Streptomyces avermitilis num meio nutriente aquoso que compreende uma fonte assimilável de azoto, carbono e sais inorgânicos e um composto capaz de ser utilizado na biossíntese de agliconas de avermectina.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a S. avermitilis ter as características identificadoras de ATCC 53677.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a S. avermitilis ser S. avermitilis ATCC 53677.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o composto ter a fórmula



em que R é um grupo de cadeia ramificado na posição alfa, e em que o átomo de carbono ao qual está ligado o grupo -COOH está também ligado a pelo menos dois outros átomos ou grupos diferentes de hidrogénio; ou ser um composto convertível no referido composto durante o processo de fermentação.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4 caracterizado por R ser um grupo C_3-C_8 alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoialquilo ou alquiltioalquilo ramificado na posição alfa; um grupo cicloalquiloalquilo C_5-C_8 em que o grupo alquilo é um grupo alquilo C_2-C_5



ramificado na posição alfa; um grupo cicloalquilo C_3-C_8 ou cicloalquenilo C_5-C_8 , os quais podem ser facultativamente substituídos por metileno ou por um ou mais grupos alquilo C_1-C_4 ou átomos halo; ou um anel heterocíclico contendo oxigénio ou enxofre de 3 a 6 membros, o qual pode ser saturado, ou total ou parcialmente insaturado e que pode facultativamente ser substituído por um ou mais grupos alquilo C_1-C_4 ou átomos halo, ou um composto convertível no referido composto durante o processo de fermentação.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o composto convertível no substrato $RCOOH$ ser $R-(CH_2)_n-Z$, em que R é como previamente definido; n é 0, 2, 4 ou 6; e Z é $-CH_2OH$, $-CHO$, $-COOR^5$, $-CH_2NH_2$ ou $-CONHR^6$, em que R^5 é H ou alquilo (C_{1-6}); R^6 é hidrogénio, alquilo (C_1-C_4), $-CH(COOH)CH_2COOH$, $-CH(COOH)(CH_2)_2COOH$ ou $-CH(COOH)(CH_2)_2SCH_3$.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por R ser

ciclobutilo
 ciclopentilo
 ciclo-hexilo
 ciclo-heptilo
 2-metilciclopropilo
 3-ciclo-hexenilo
 1-ciclopentenilo
 1-ciclo-hexenilo
 3-metilciclo-hexilo (cis/trans)
 4-metilenociclo-hexilo
 3-metilciclobutilo
 3-metilenociclobutilo
 3-ciclopentenilo
 1-ciclopropiletilo
 3-fluorociclobutilo



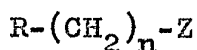
4,4-difluorociclo-hexilo
isopropilo
sec-butilo
2-pentilo
2,3-dimetilpropilo
2-hexilo
2-pent-4-enilo
2-metiltioetilo
S-2-pentilo
R-2-pentilo
2-tienilo
3-tienilo
4-tetra-hidropiraniolo
3-furilo
2-clorotienilo
3-tetra-hidrotienilo
4-metiltio-2-butilo
4-tetra-hidrotiopiraniolo
4-metoxi-2-butilo ou
4-metiltio-2-butilo

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por R ser derivado de um ácido carboxílico de fórmula



9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por R ser ciclopentilo, ciclo-hexilo ou tienilo.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por R ser derivado de um composto convertível em R-COOH durante a fermentação em que o referido composto tem a fórmula



na qual R é como previamente definido; n é 0, 2, 4 ou 6; Z é $-CH_2OH$, $-CHO$, $-COOR^5$, $-CH_2NH_2$ ou $-CONHR^6$, em que R^5 é alquilo (C_{1-6}); R^6 é hidrogénio, alquilo (C_{1-4}), $-CH(COOH)CH_2COOH$, $-CH(COOH)(CH_2)_2COOH$ ou $-CH(COOH)(CH_2)_2SCH_3$.

11ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por R não ser isopropilo ou (S)-sec-butilo quando é um grupo alquilo C_3-C_8 ramificado na posição alfa.

12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a estirpe de S. avermitilis ser S. avermitilis ATCC 53677.

Lisboa, 21 de Outubro de 1988

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