

(11) *Número de Publicação:* PT 91469 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07H013/12 A C07C059/60 B

C07F009/04 B C12N001/20 B

C12N009/16 B C12P019/26 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1989.08.17

(30) *Prioridade:* 1988.08.20 DE 3828337

(43) *Data de publicação do pedido:*
1990.03.08

(45) *Data e BPI da concessão:*
10/94 1994.10.04

(73) *Titular(es):*

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
BRUNINGSTRASSE, 64 D-6230 FRANKFURT/MAIN 80
DE

(72) *Inventor(es):*

GERHARD SEIBERT DE
WERNER ARETZ DE
DIRK BOTTGER DE
ALOIS TUMULKA DE
PETER WELZEL DE

(74) *Mandatário(s):*

JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA
RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA MOENOMICINA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Werner Aretz, Dr. Dirk Bottger, Prof. Dr. Gerhard Seibert, Dr. Alois Tumulka, Prof. Dr. Peter Welzel e Kurt Hobert, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MOENOMICINA".

DESCRIÇÃO

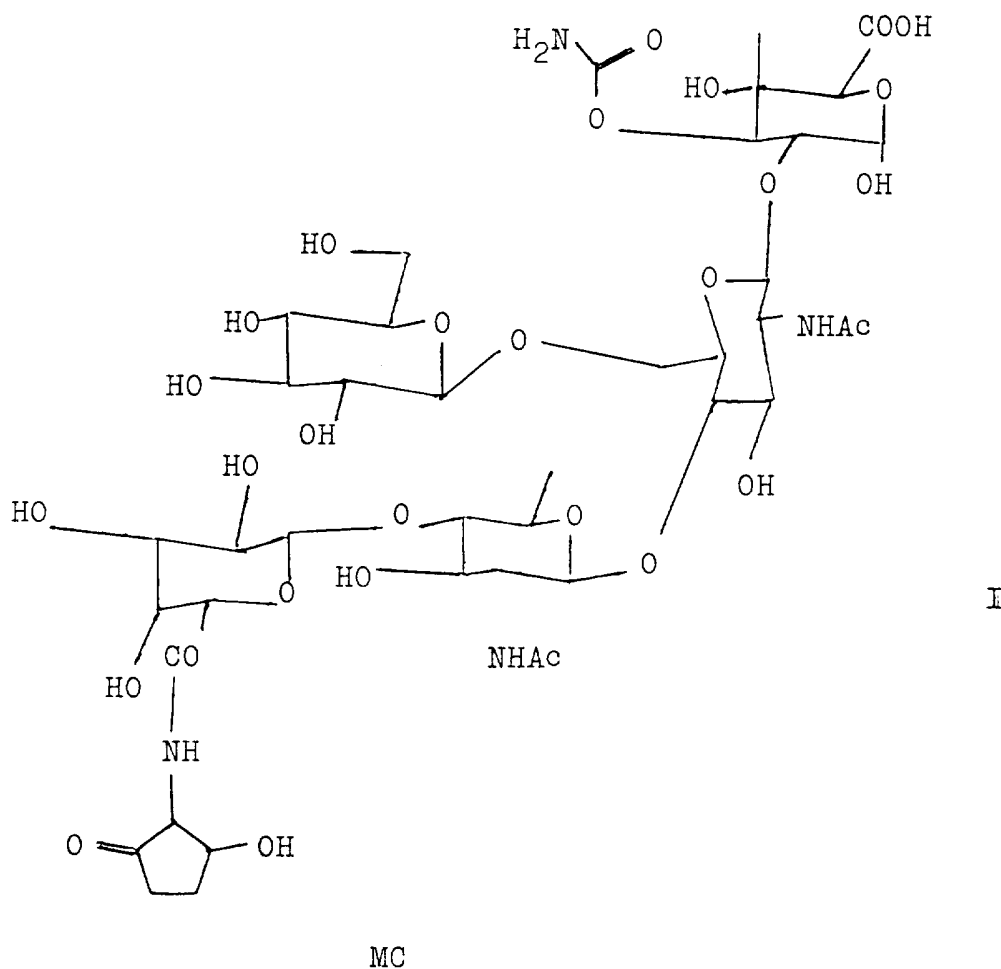
A moenomicina A (Figura 1) é o componente principal da Flavomicina utilizada na alimentação de animais. Como todos os antibióticos de fosfoglicolípídeos conhecidos, inibe a biossíntese da cadeia de peptidoglicano da parede das células das bactérias. Ensaio mais exactos mostraram que a reacção da transglicosilação da proteína de ligação da penicilina lb de E. coli é fortemente inibida por esta substâncias (Huber G., Antibiotics, V-1, páginas 135 a 153 (1979)). Os ensaios para degradar enzimaticamente ou microbiologicamente os antibióticos de fosfoglicolípídeos fracassaram até hoje.

Surpreendentemente, a Requerente isolou, a partir de um fermentador para a preparação de Flavomicina contaminado com Streptomyces chanaensis uma nova espécie de

bacilos que pode degradar os antibióticos de fosfoglicolípido de maneira a obterem-se produtos finais definidos. Estes produtos finais possuem actividade antibiótica ou podem ser utilizados como componentes da síntese para novos inibidores de transglicosilase.

A invenção refere-se, portanto, a:

1. Bacillus spec. DSM 4675, assim como aos seus variantes e mutantes.
2. Ao produto da degradação da moenomicina A com a fórmula I



3. Ao produto da degradação dos antibióticos de fosfoglicolípido com a fórmula geral



na qual

R^1 significa hidrogénio ou um grupo fósforo ($-PO(OH)_2$); e

R^2 é um grupo alquilo em C_1 até C_{55} que pode ser ramificado ou não ramificado, saturado ou não saturado.

4. às enzimas com o auxílio das quais se podem degradar os antibióticos de fosfoglicolípídeos na ligação fosfoglicosídica ou o produto da degradação caracterizado em 3. na ligação de éster de monofosfato.
5. A um processo para a preparação dos produtos da degradação caracterizados nas alíneas 2. e 3. que se caracteriza pelo facto de se incubarem os antibióticos de fosfoglicolípídeos com o Bacillus spec. DSM 4675.
6. À utilização das substâncias caracterizadas nas alíneas 2. e 3. como elementos de síntese para a preparação de inibidores de transglicosilase ou como substâncias que actuam antibioticamente.

A invenção é em seguida descrita por menorizadamente, em especial, nas suas formas de realização preferidas; ainda se define nas reivindicações.

A Bacillus spec. foi depositada sob o Número DSM 4675, nas condições de Tratado de Budapeste, na Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH em Braunschweig, República Federal da Alemanha, em 23 de Junho de 1988. A estirpe pode caracterizar-se da seguinte maneira:

1. Propriedades taxonómicas do Bacillus sp. DSM 4675

A) Morfologia

- bastonetes móveis; até 5 micrómetros de comprimento; parcialmente em cadeia curtas;
- esporos que se encontram nas extremidades; esporângio inchado;
- Gram-positivo.

B) Desenvolvimento em diversos meios ($28^{\circ}C$; quarenta e oito Horas)

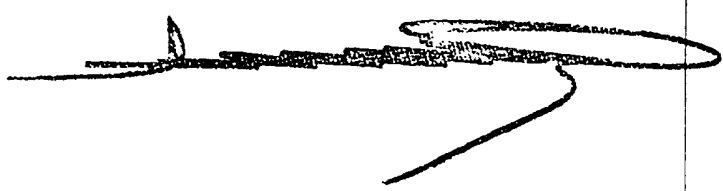
1. Meio com antibiótico 3 (Difco)

- colónias bem definidas, sobrepostas, com 1 - 2 milíme-

- 
- tros de diâmetro;
2. Caldo de Luria (Friptona Bacto 10 g/l; levedura Bacto 5 g/l; NaCl 5 g/l)
 - colônias lisas, redondas, brilhantes, com o diâmetro de 2 - 3 milímetros; opacas.
 3. Caldo nutritivo (Difco)
 - colônias brancas brilhantes, com a periferia irregular.
 4. Agar contendo ureia de acordo com Christensen (Difco)
 - desenvolvimento positivo.
 5. Agar de McConkey (Difco)
 - desenvolvimento positivo.
 6. Agar BROLAC (lactose) (Difco)
 - desenvolvimento positivo.
 7. Agar de Citrato de Simmons (Difco)
 - desenvolvimento negativo.
 8. Ausência de desenvolvimento em presença de 7 e de 10% de NaCl num meio de extracto de carne/peptona (Difco).

C) Propriedades Fisiológicas

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. Oxidase | + |
| 2. Catalase | + |
| 3. Hemólise | - |
| 4. Aminopeptidase | - |
| 5. Redução de nitratos | - |
| 6. Desaminase de fenilalanina | - |
| 7. Desenvolvimento a 30° C | + |
| a 40° C | + |
| a 50° C | + |
| 8. Desenvolvimento anaeróbio | |
| - sólido | - |
| - líquido | - |
| 9. Formação de gases em glucose | - |
| 10. Formação de indol | - |
| 11. Arginina-di-hidrase | - |



12.	Degradação de ureia	-
13.	Hidrólise de esculina	+
14.	Degradação de gelatina	-
15.	Beta-galactosidade	+
16.	Lisina-descarboxilase	-
17.	Ornitina-descarboxilase	-
18.	Produção de H ₂ S	-
19.	Triptofano-desaminase	-
20.	Fosfatase alcalina	-
21.	Reacção de Voges-Proskauer	-.

D) Fermentação de Hidratos de Carbono

Fonte de C	Assimilação	Formação de ácido
Adipato	-	
Adonit	-	
Arabinose	+	+
Caprato	-	
Citrato	-	
Dulcit	-	
Fructose	+	+
Galactose	-	
Gluconato	+	
Glucose	+	+
Inosit	+	
Lactose	+	+
Malato	-	
Malonato	-	
Maltose	+	+
Manite	+	+
Manose	+	+
Melibiose	+	+
Fenylacetato	-	
Rafinose	+	+
Rhamnose	-	
. Sacarose	+	+
. Salicin	-	



Sorbite	-	
Trehalose	+	+
Xilite	-	-
Xylose	+	+
N-Acetil-Glucosamina	-	+

Tendo em atenção as características taxonómicas e a tabela auxiliar de "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Vol. 2, Williams and Wilkins Publ., Baltimore, 1986), a estirpe é classificada como pertencente à espécie Bacillus.

Para a determinação do tipo, realizaram-se ensaios em paralelo com culturas típicas de comparação de Bacillus macerans, circulans, lentus, alcalophilus, stearothermophilus, licheniformis, polymyxa e fastidiosus. Todas as estirpes de comparação apresentaram nítidas diferenças em relação ao Bacillus spec. DSM 4675. Também nenhuma destas estirpes degradou os antibióticos de fosfoglicolípidos, especialmente moenomicina A. Conclui-se, portanto, que a estirpe DSM 4675 é um novo género.

A invenção refere-se também respectivamente aos mutantes e variantes que se podem obter espontaneamente como se sabe ou por tratamento com meios físicos, por exemplo, irradiação, como, por exemplo, raios ultravioletas ou raios X, Y ou com mutagénicos químicos como, por exemplo, metano-sulfonato de etilo (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG) ou 2-hidróxi-4-metoxi-benzofenona (MOB).

Como fontes de carbono preferidas para a fermentação aeróbica de Bacillus spec. DSM 4675, são apropriados hidratos de carbono assimiláveis e álcoois de açúcar, como glicose, lactose ou manite, assim como produtos naturais que contêm hidratos de carbono, como extracto de malte.

Como substâncias alimentares que contêm azoto preferidas, interessam aminoácidos, péptidos, proteínas, assim como os seus produtos de degradação, como peptona ou triptona e ainda extractos de carne, sementes moídas, por exemplo, de milho, de feijão, de soja ou de plantas de algodão, resíduos de destilação de fabricação de álcool, farinha de carne

ou extractos de levedura, mas também sais de amónio e nitratos.

Além disso, a solução nutritiva pode conter, por exemplo, cloretos, carbonatos, sulfatos ou fosfatos de metais alcalinos ou alcalino-terrosos, ferro, zinco e manganês, como sais inorgânicos adicionais.

O desenvolvimento do microrganismo e a formação das enzimas necessárias às reacções de degradação de acordo com a presente invenção são especialmente boas num meio nutritivo com amido de milho, farinha de soja, sacarose, glicerina, peptona e/ou líquido de fermentação de milho, como fontes de carbono e de azoto.

A fermentação realiza-se aerobicamente, ou seja, por exemplo, em condições submersas, com sacudimento ou agitação, em vasos para sacudimento ou fermentadores, eventualmente com introdução de ar ou de oxigénio. A fermentação pode realizar-se num intervalo de temperatura desde cerca da temperatura ambiente até 50° C, de preferência a cerca de 35 até 37° C. O tempo de cultura está compreendido, em geral, entre vinte e quatro e quarenta e oito horas.

As culturas de bacilos de DSM 4675 assim obtidas ou as preparações que os contêm podem ser utilizadas para a degradação dos antibióticos de fosfoglicolípido. A esta classe pertencem, especialmente, os antibióticos do grupo da moenomicina, por exemplo, a folipomicina, a prasinomicina, a diumicina (macarbomicina), a esancomicina, a prenomicina e a teicomicina, assim como outras substâncias estruturalmente semelhantes que apresentam ácido fosfoglicérico correspondentemente funcionalizado:

- 1) S. Takahashi e col., Tetrahedron Lett. 1983, 499;
- 2) F. L. Weisenborn e col., Nature 213, 1092 (1967);
- 3) S. Takahashi e col., J. Antibiot. 26, 542 (1973).

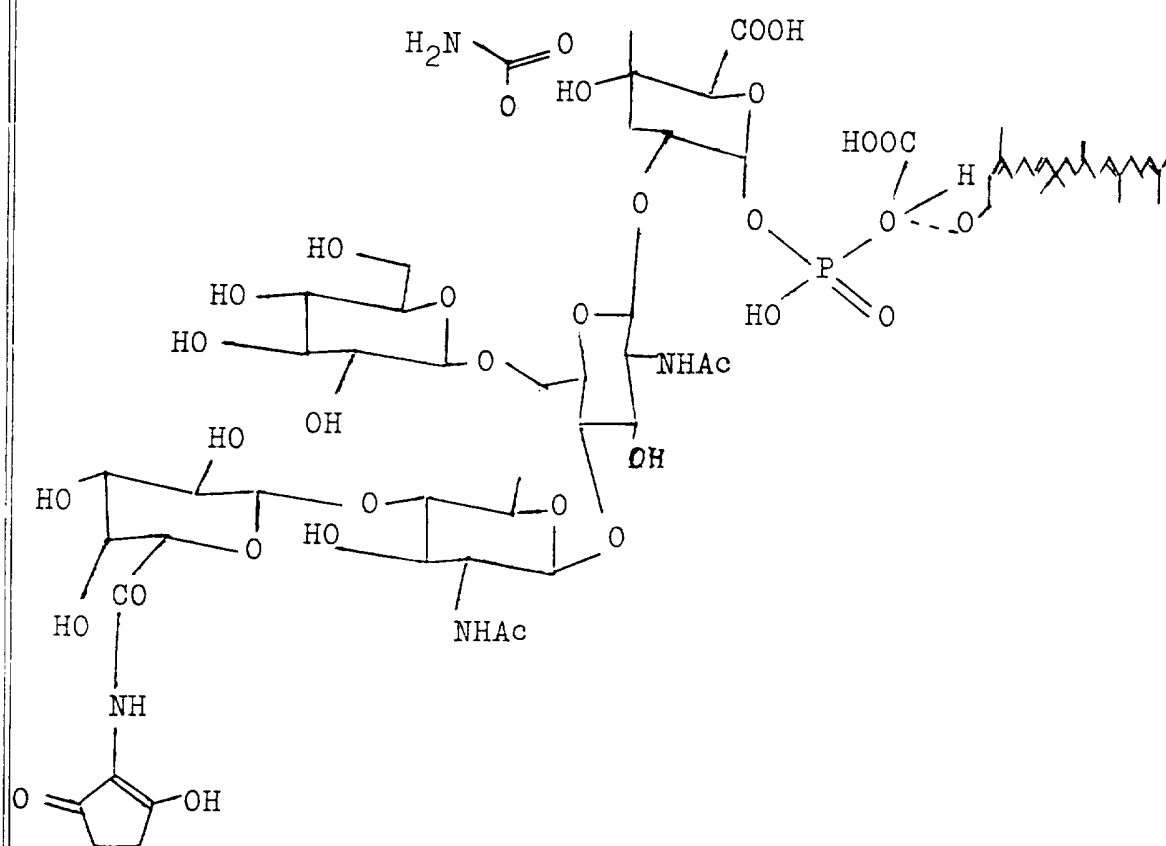
De maneira especialmente preferida, degradam-se com as enzimas a moenomicina, por exemplo, a flavomicina.

Se se utilizam células de Bacillus, é vantajoso permeabilizar estas, por exemplo, com sais de cetil-trimetilamónio. É igualmente possível trabalhar com isolados de proteína obtidos a partir de células de bacilos, ou

com, por exemplo, extractos de enzima enriquecidos parcialmente por des-salificação ou cromatografia ou naturalmente com as enzimas purificadas. É ainda possível empregar enzimas e células na forma livre ou na forma imobilizada.

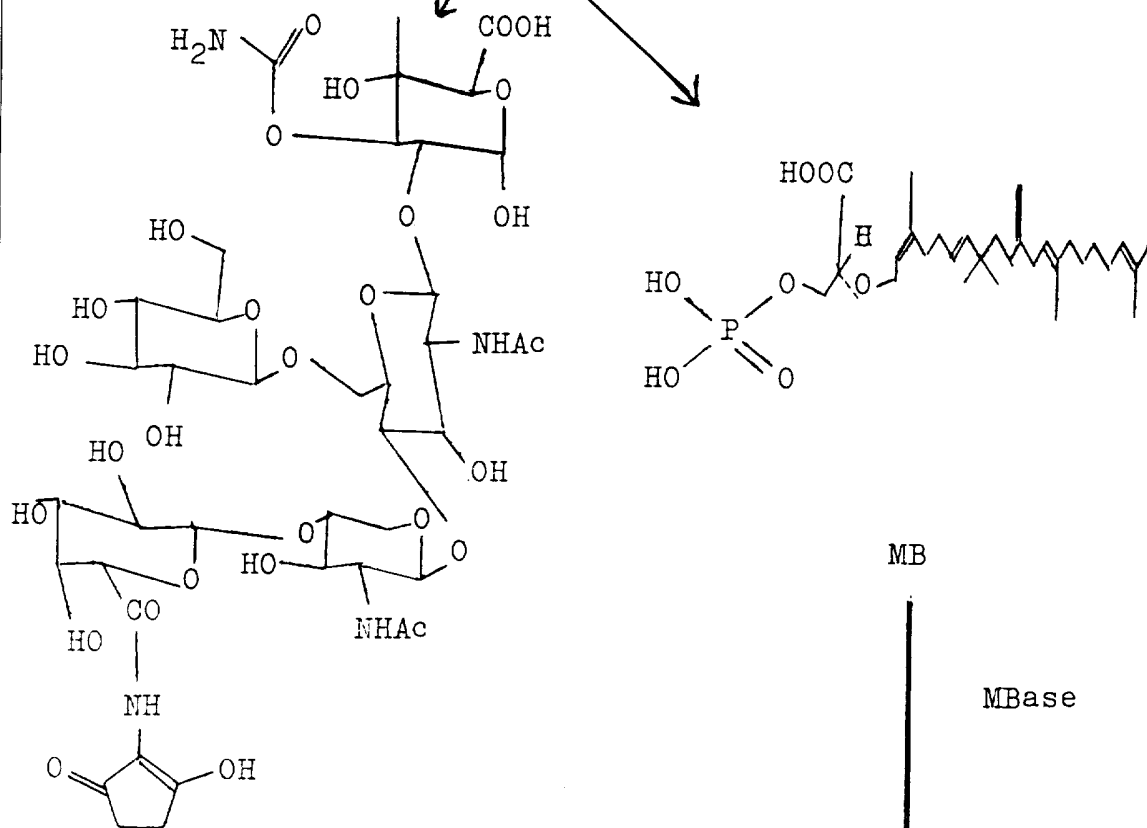
A desagregação enzimática, no caso, por exemplo, da moenomicina A é representada pelo seguinte esquema:

Desagregação Enzimática de Moenomicina A



MOENOMICINA A

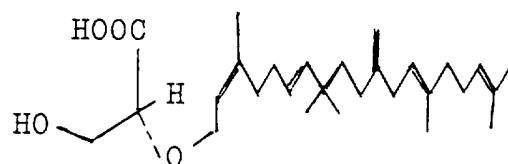
Moenomicinase



MB

MBase

MC



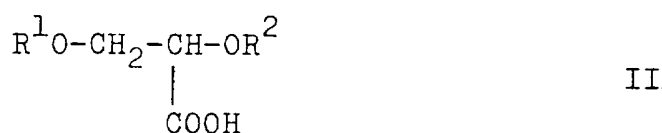
MA



A partir deste esquema, conclui-se que, para a preparação de produtos de degradação são necessárias duas enzimas. Para a separação da ligação fosfoglicosídica, é necessária uma enzima que foi designada pelos inventores por moenomicinase. A moenomicinase está associada à membrana de citoplasma de Bacillus spec. DSM 4675 e pode obter-se de acordo com métodos conhecidos para isolamento de enzimas a partir dos microrganismos.

A moenomicinase tem um valor ótimo de pH compreendido entre cerca de 8,0 - 8,5, em especial, 8,2 - 8,3. A temperatura ótima da enzima está compreendida entre 45 - 55° C, em especial, a 49 - 51° C. A moenomicinase tem um valor de K_m para a moenomicina A compreendido entre 4 e 10 milimolar.

Obtêm-se dois produtos de eliminação. o produto de eliminação I consiste no componente de açúcar do antibiótico de fosfoglicolípido. Obtém-se ainda o produto de eliminação com a fórmula geral II



na qual

R^1 é um grupo fósforo; e

R^2 é um grupo alquilo em C_5 até C_{55} , de preferência, um grupo alquilo em C_{10} até C_{30} e, especialmente, um grupo alquilo em C_{20} até C_{25} , que respectivamente pode ser ramificado ou não ramificado, saturado ou não saturado, de preferência, ramificado e não saturado.

De preferência, utiliza-se moenomicina como substrato, de modo que, como produtos de separação, se obtêm as substâncias que correspondem ao composto MC, assim como os compostos MB e MA.

Para a desfosforilação do lípido de fosfoglicerina, obtido por incubação com moenomicinase, de fórmula geral II, na qual R^1 é hidrogénio, é necessária uma outra enzima que igualmente pode ser obtida a partir do microrga



nismo de acordo com a presente invenção. Esta enzima foi designada pelos inventores como MBase. A MBase pode igualmente ser isolada a partir do microrganismo, de acordo com métodos em si conhecidos. Por exemplo, rompem-se as células com ultra-sons e purifica-se o extracto bruto ou por fraccionamento com sulfato de amónio (25 - 55% de saturação) ou por ultracentrifugação. Em seguida, realiza-se a diálise. Em seguida, separa-se por cromatografia a moenomicinase e a MBase.

A MBase é inactivada a temperaturas que são superiores a 37° C, assim como no domínio do pH ácido a partir de pH 5 progressivamente a pH que diminui.

A separação da moenomicina assim como dos fosfoglicolipidaantibióticos pode realizar-se, como já se referiu, com células completas e isoladas de enzimas.

A reacção realiza-se, em geral, em meio aquoso, a um valor de pH compreendido entre cerca de 5,5 - 8,5, de preferência, a pH 7 - 8.

O tempo de realização da reacção está compreendido, em geral, entre cinco e quarenta e oito horas, de preferência, igual a cerca de vinte e quatro horas. A temperatura de realização da reacção pode variar entre 4 e 60° C, de preferência, entre 30 e 37° C. A concentração de substrato em geral, deve estar compreendida dentro do intervalo de 0,1 a 5%, de preferência, entre 1 e 2%.

A reacção pode igualmente realizar-se a temperaturas mais altas ou mais baixas e a valores de pH mais altos ou mais baixos do que os indicados; no entanto, a moenomicinase é então menos activa.

Como produtos de reacção da moenomicina A, obtêm-se as substâncias designadas no esquema como MB e MC. O produto MA pode obter-se por incubação de MB com MBase, a 30 até 37° C, de preferência de 35 até 37° C e a pH compreendido entre 5,5 e 8,5, de preferência, entre 6 e 8, durante um intervalo de tempo igual a cerca de vinte e quatro horas.

Os produtos da reacção mencionados podem ser utilizados como antibióticos (por exemplo, MB) ou como elementos de síntese para os inibidores da transglicosilase (por exemplo, MA e MC).

Em seguida, descreve-se mais pormenorizadamente a invenção por meio de Exemplos. As indicações das percentagens são, se não se indica outra coisa, percentagens em peso.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Conservação da Estirpe de Bacillus spec. DSM 4675

A estirpe de Bacillus spec. DSM 4675 é mantida no seguinte meio nutritivo sólido (meio 1):

Bacto triptona (Difco)	10 g/l
Extracto de levedura (Difco)	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

pH = 7,2.

O meio é distribuído por tubos de ensaio e esterilizado a 121° C durante trinta minutos; seguidamente arrefece-se, vacina-se com a cultura e incuba-se a 37° C durante dois a três dias.

Uma suspensão da cultura adulta serve como inóculo da seguinte cultura principal que contém moenomicina (Meio 2):

Amido de milho	40 g/l
Farinha de soja	35 g/l
Sacarose	10 g/l
CaCO ₃	8 g/l
Solução de maceração de milho	4 g/l
CoSO ₄	20 mg/l
(R) Genapol (éster alquil-poliglicólico)	5 g/l
Moenomicina A	3 g/l (filtrada para este rilização)

pH = 7,6

Incubam-se 30 ml deste meio por balão de Erlenmeyer de 300 ml depois da vacinação, durante oito a quarenta e oito horas a 37° C e cento e noventa rotações

por minuto. A análise por cromatografia em camada fina do filtrado da cultura mostra que, como produtos da separação da moenomicina, se detectam os compostos MA, MB e MC e que a moenomicina introduzida está completamente desaparecida no fim da reacção.

Exemplo 2

Preparação de extractos Isentos de Células

Para a preparação de extractos isentos de células cultiva-se Bacillus spec. DSM 4675 em fermentador. Para o efeito, utilizam-se 10 ml de população de células da placa de agar para a vacinação de uma pré-cultura (500 ml de Meio 2 sem flavomicina, num balão de Erlenmeyer de 2 litros), que se incuba seguidamente durante vinte e quatro horas a 37° C e 190 rotações por minuto.

Como andar de cultura principal serve um fermentador laboratorial de 12 litros, cheio com 9 litros de Meio 3:

Peptona	12,5 g/l
Glicerina	20,0 g/l
Citrato	2,0 g/l
K ₂ HPO ₄	1,5 g/l
MoSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g/l
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0,04 g/l
Desmophen (propilenoglicol)	5,0 ml/l

pH = 6,8.

Vacina-se este meio com 500 ml de pré-cultura e incuba-se a 37° C durante vinte e quatro horas, com 300 rotações por minutos e uma taxa de arejamento de 0,5 vvm.

Separa-se por centrifugação a cultura depois de desenvolvida e ressuspende-se a pasta de células em tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) 50 mM (1 grama de células húmidas + 2 ml de tampão). Em seguida, desfazem-se as células com ultra-sons empregando uma French Press (R) ou Dyno Mill (R) e utiliza-se o extracto bruto resultante para a reacção.



Numa mistura de ensaio com 100 micro litros de extracto bruto, 12 mg de moenomicina A e 900 microli tros de tampão de fosfato de potássio (pH 8,0) 50 mM, desagrega-se 50% do substrato empregado durante sete a vinte e quatro horas a 37° C. Como produtos da reacção, encontram-se MA, MB e MC.

Exemplo 3

Reacção preparativa de moenomicina A

Realizam-se reacções preparativas num fermentador de 12 litros com 8,2 litros de tampão de fosfato de potássio (pH 8,0) 50 mM, 800 ml de extracto bruto de enzima e 100 gramas de moenomicina A, a 37° C e 100 rotações por minuto. O decurso da reacção é seguido por meio de cromatografia em camada fina. Depois de decorridas oito e e quarenta e oito horas, liofiliza-se toda a mistura reaccional. A desagregação da moenomicina é, em geral, igual a 40 - 60% (análise por ultravioleta do eluído de cromatografia em camada fina). Como produtos da reacção, obtêm-se MA, MB e MC.

Exemplo 4

Preparação dos produtos da degradação

Introduzem-se 100 gramas de mistura seca por liofilização da mistura reaccional enzimática em 2 litros de água e extrai-se por duas vezes com 2 ml de acetato de etilo de cada vez. Para completa separação de fases, foi necessária a centrifugação. Secaram-se com sulfato de sódio os extractos **orgânicos** depois de reunidos, filtrou-se e evaporou-se até à secura. Obtém-se 0,4 grama (0,4%) de óleo castanho-escuro que, de acordo com o ensaio de cromatografia em camada fina no sistema de n-butanol/ácido acético/água = 3 : 1 : 2 com gel de sílica (Merck DC-Alufolien 60 F254), com coloração com reagente de ácido fosfomolibdaíro/sulfato de cério (IV) (seguidamente, abreviadamente designado por PMS), consistia principalmente no componente MA (valor de Rf = 0,85).

Extraíu-se seguidamente a fase aquosa assim obtida duas vezes com 2 litros de n-butanol de cada

vez. Neste caso, também foi necessária a centrifugação para a separação de fases. As fases butanólicas, depois de reunidas, foram seguidamente concentradas o mais possível, o resíduo foi retomado numa pequena quantidade de água e, em seguida, liofilizado. Obtiveram-se 7,4 gramas (7,4%) dum pó amarelado que, de acordo com os ensaios de cromatografia em camada fina (com as condições acima referidas e com o mesmo método de detecção), consistia principalmente no componente MB ($R_f = 0,52$).

A fase aquosa assim isentada de substâncias não polares foi liofilizada. A quantidade de resíduo assim obtido foi de 76,9 gramas (76,9% de uma quantidade total de 85%). O pó amarelo claro assim obtido consistia, de acordo com a cromatografia em camada fina, numa substância principal polar designada por MC ($R_f = 0,1$), moenomicina A e subprodutos secundários.

Os produtos brutos assim obtidos contendo os componentes MA, MB e MC foram ainda mais purificados, procedendo como se descreve seguidamente.

Exemplo 5

a) Purificação do produto de degradação MA

Cromatografaram-se 400 mg do produto bruto MA em 120 gramas de gel de sílica (Merck 60, 15 - 40 mcm), que se tinha regulado para um valor de pH igual a 7,5. (O material da coluna para esse efeito foi previamente tratado da seguinte forma: o gel de sílica foi agitado durante uma hora em 500 ml de HCl 2 N, e em seguida separado por filtração sob sucção e lavado até à neutralidade. Em seguida, regulou-se a um valor de pH igual a 7,5 com NaOH 1 N e, seguidamente, lavou-se com 2 litros de água e 500 ml de metanol. O material assim previamente tratado foi seco durante a noite a 120°C e activado.

Como agente de eluição utilizou-se clorofórmio/etanol = 1 : 1. A substância foi adicionada à coluna em 3 ml de mistura dissolvente e recolheram-se duzentas e dezasseis fracções cada uma com 2,5 ml. Com análise por cromatografia em camada fina (chapas de DC e detecção como se descreveu no Exemplo 1; sistema eluente como meio de eluição da

coluna) foram reunidas as frações 115 - 175, secas sobre sulfato de sódio e seguidamente evaporadas até à secura. Obtiveram-se 27 mg de MA espectroscopicamente puro.

b) Purificação do produto da degradação MB

Cromatografaram-se 3,1 gramas do produto bruto contendo MB proveniente da extracção em 500 gramas de gel de sílica que foi regulada a um valor de pH de 7,5 procedendo de acordo com o processo esclarecido no Exemplo 2. Com utilização de uma instalação de cromatografia de média pressão (MPLC), eluíu-se com um caudal de 10 ml/minuto a uma pressão de 2 a 5 bar, com clorofórmio/etanol/água - 4 : 7 : 1,5. Depois de um intervalo prévio de 600 ml, recolheram-se duzentas e vinte frações cada uma com 10 ml e purificaram-se por cromatografia em camada fina. Juntamente com as frações mistas que contêm MB, nas frações 90 e 170 depois da evaporação, retomada em água e liofilização, obtiveram-se 1,28 gramas de MB puro.

c) Purificação do produto da degradação MC

Cromatografaram-se igualmente sob pressão 2,2 gramas do produto bruto polar proveniente da fase aquosa de extracção (MPLC). Empregaram-se 500 gramas de gel de sílica com um valor de pH igual a 7,5 (processo de acordo com o Exemplo 2) e como agente eluente utilizou-se acetato de etilo/i-propanol/água = 4 : 5 : 5. Depois de se suspender a amostra da toma em metanol com 15 gramas de gel de sílica, se evaporar o dissolvente e se introduzir o suporte assim tratado numa pré-coluna, eluíu-se com um caudal de 5 ml/minuto e sob uma pressão de 2 - 4 bar. Depois de uma passagem prévia de 940 ml, efectuou-se o subsequente fraccionamento em duzentas e cinquenta frações cada uma com 10 ml. As frações foram ensaiadas por cromatografia em camada fina com sistema acetato de etilo/i-propanol/água = 1 : 1 : 1 com coloração com o reagente PMS ou detecção da absorção de UV a 254 nm e reuniram-se. Juntamente com as frações mistas, obtiveram-se nas frações 120 - 190, depois de obtenção de uma fase aquosa e subsequente liofilização 1,3 gramas de MC puro, que foi submetido a ensaio espectroscópico.



Exemplo 6

Esclarecimento estrutural dos produtos MA e MB obtidos por degradação com Enzimas da Moenomicina A

(Os números das fórmulas de estrutura referem-se ao esquema formular da página 19)

Para MA, derivou-se a estrutura 1a. A ordenação da estrutura baseia-se no espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de 1a, reacção de 1a com diazometano, que originou o éster de metilo 1b, que é caracterizado pelo espectro de ressonância magnética nuclear protónica e pelo espectro de massas EI.

Para MB, deduziu-se a estrutura 2 com base no espectro de ^{13}C e de massas FAB. A hidrogenação do composto 2 originou o derivado deca-hidrogenado 3a, que reagiu com diazometano para se obter o composto 3b, que já se tinha obtido previamente por outras vias a partir da moenomicina A.

O facto de o composto 2 (MB) poder ser transformado enzimaticamente no composto 1a (MA) está de acordo com as estruturas referidas.

Descrição dos Ensaio

1a

Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (100,6 MHz, CD_3OD) : parte de moenocinol : δ = 67,5 (C-1), 123,5 (C-2), 141,6 e 141,8 (C-3 e C-7), 32,3 e 32,5 (C-4 e C-5), 126,7 (C-6), 35,9 (C-8), 40,9 (C-9), 30,7 (C-10), 151,1 (C-11), 33,4 (C-12), 122,7 (C-13), 137,3 (C-14), 36,4 (C-15), 27,7 (C-16), 125,3 (C-17), 132,2 (C-18), 25,9 (C-19), 17,8 (C-20), 16,1 (C-21), 109,2 (C-22), 27,3 (C-23 e C-24), 23,8 (C-25).

parte do ácido glicérico : δ = 175,9 (C-1), 80,6 (C-2), 64,1 (C-3).

$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$ (44,6).

1b

Transformou-se 1a em solução aquosa com (R)Dowex (forma H^+) na forma H. Dissolveu-se 1a (forma H^+ , 18,5 mg, 0,04 mM) em metanol (3 ml) e, a 0°C , misturou-

~~CONFIDENTIAL~~

-se com excesso de solução etérea de diazometano. Manteve-se a mistura reaccional a 0° C durante duas horas e a 20° C durante doze horas e depois evaporou-se até à secura. A cromatografia em coluna (5 gramas de SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 2 : 1), originou lb (3 mg).

Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Protónica (80 MHz, CDCl₃) : δ = 0,96 (s, 6H, CH₃-23 e CH₃-24), 1,61 (s, 6H), 1,68 (s, 3H), 1,73 (s, 3H) (4×CH₃), 1,90-2,12 (H de alilo), 2,62 (largo d, J = 7Hz, CH₂-12), 3,78 (s, OCH₃), 3,60-4,30 (OCH₂- e OCH-Sinais), 4,62 (largo s, CH₂-22), 4,87-5,47 (olefina H).- C₂₉H₄₈O₄ (460.7), MS: m/z (%) = 460 (0,03), 271 (10), 230 (19), 199 (68), 43 (100).

2

Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (100,6 MHz, D₂O) : parte de moenocinol : δ = 68,6 (C-1), 124,5 (C-2), 142,9 (C-3), 34,6 (C-4), 34,0 (C-5, C-10), 128,1 (C-6), 143,6 (C-7), 37,8 (C-8), 44,1 (C-9), 151,4 (C-11), 37,2 (C-12), 123,5 (C-13), 138,3 (C-14), 42,2 (C-15), 29,1 (C-16), 126,9 (C-17), 133,1 (C-18), 28,0 (C-19), 19,9 (C-20), 18,2 (C-21), 111,2 (C-22), 29,7 (C-23, 24), 25,9 (C-25). Parte do ácido glicérico: δ = 179,0 (C-1), 81,8 (C-2), 68,6 (C-3). C₂₈H₄₇O₇P (526,7)

Espectro de Massas FAB (Matriz : DMSO/glicerina): m/z = 615 (M-3H+4Na)⁺, 593 (M-3H+4Na)⁺, 593 (M-2H+3Na)⁺, 571 (M-H+2Na)⁺, 492, 267, 231, 185, 165, 143, 115.

3a

Agitaram-se, em atmosfera de H₂ sob condições normais, o composto 2 (14,9 mg, 28,3 mM) e PtO₂ (4 mg) em metanol (3 ml) e ácido acético (50 microlitros), durante três dias. Depois de se separar o catalisador por filtração e se evaporar à secura, obteve-se 3a (13,5 mg). C₂₈H₅₇O₇P (536,7).

Espectro de Massas FAB (matriz : DMSO/glicerina) : m/z 625 (M-3H+4Na)⁺, 603 (M-2H+3Na)⁺, 581 (M-H+2Na)⁺, 558 (M-H+Na)⁺, 514, 500, 498, 432, 404, 362, 340, 298, 288, 266, 186, 164, 142, 115, 93.

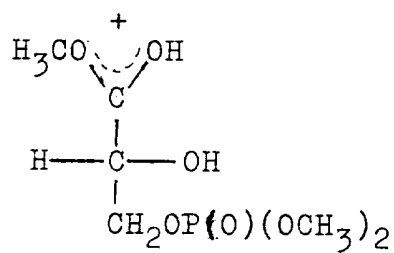
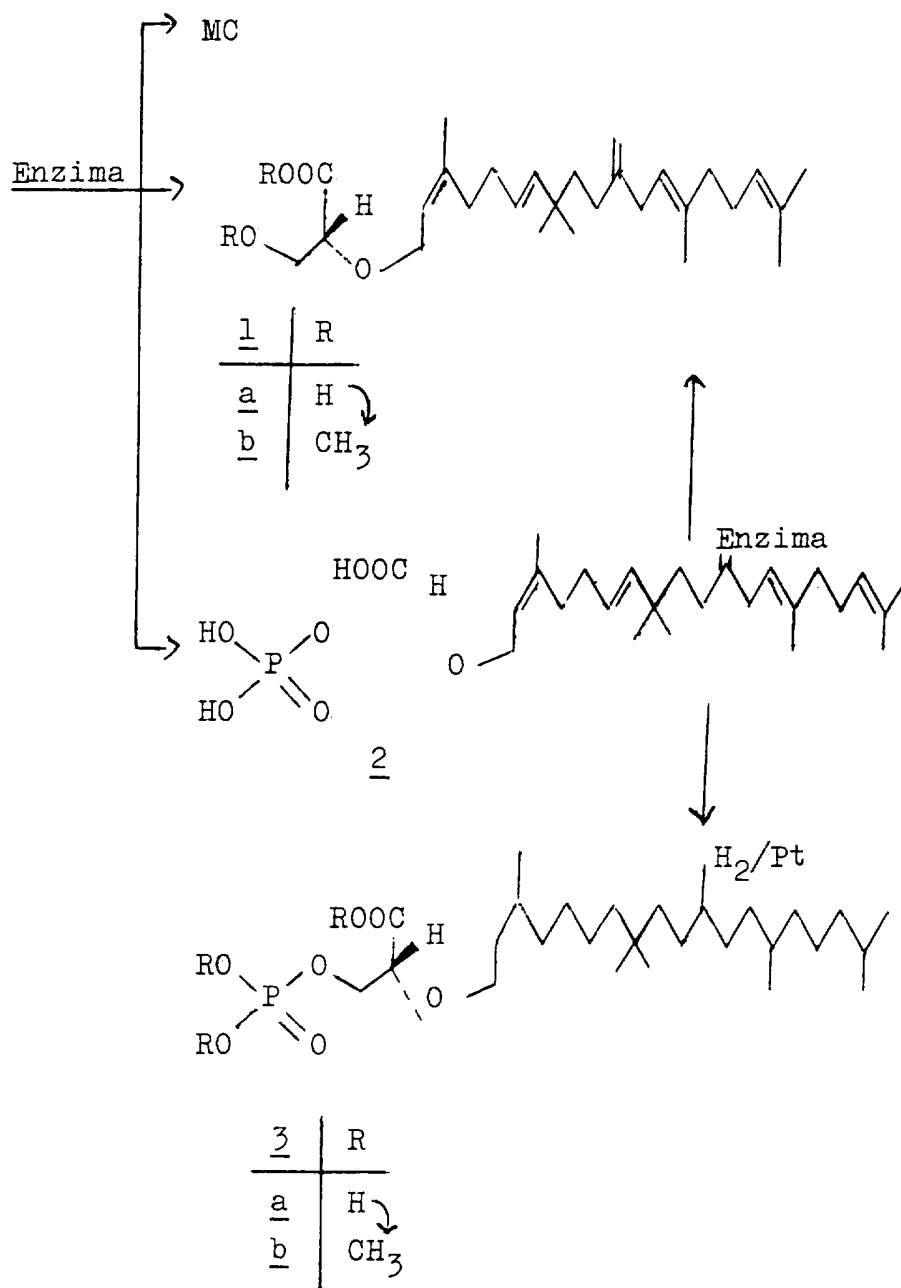
3b

Tratou-se o composto 3a em solução aquosa com uma resina permutadora de iões (Dowex-50, forma H^+) para libertar todas as funções ácido. Depois de se separar por filtração a resina, liofilizou-se. Dissolveram-se 8,5 mg (15,9 micromoles) da amostra assim tratada em metanol (2 ml). A $0^\circ C$, adicionou-se uma solução de diazometano etérea em excesso. Manteve-se a mistura reaccional durante duas horas a $0^\circ C$ e a $20^\circ C$ durante doze horas. A evaporação à secura e a cromatografia em coluna (5 gramas de SiO_2 , éter de petróleo/acetato de etilo 1 : 1), originou o composto 3b (4,0 mg).

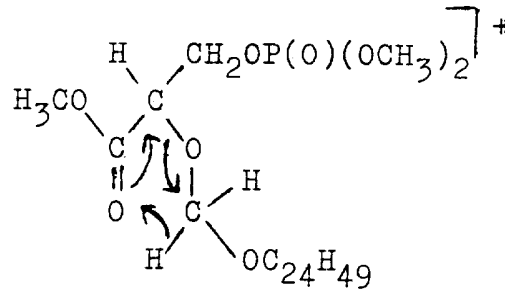
Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Protónica (80,20 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3,75$ (s, OCH_3 e 2 d, $3J_{H,P} = 10$ e 12 Hz, $P(OCH_3)_2$), 3,20 - 4,40 (OCH_2 -multipletes $OCH-$), $C_{13}H_{63}O_7P$ (578,8).

Espectro de Massas: m/z (%) = 563 (0,1, $M-CH_3$), 519 (1, $M-COOCH_3$), 452 (1, $M-(CH_3O)_2P(O)OH$), 381 (3, $M-C_{14}H_{29}$, corte da ligação entre C-8 e C-9 da parte de per-hidro-moenocinol 25) 229 (8, a), 212 (6, b), 127 (20), 57 (100).

Moenomicina A



a



b

Exemplo 7

Actividades antibióticas dos produtos separados

Para a determinação das actividades antibacterianas, realizou-se um ensaio de diluição em agar com agar de Mueller-Hinton (Antibiotics in Laboratory Medicine, V. Lorian, Ed. Baltimore, 1986, páginas 1 - 10).

Produtos de Separação	Concentração Mínima de Inibição (micrograma/mililitro)		
	Str. pyogenes 77	Staph. Aureus 503	E. coli DC2
MA	>100	>100	>100
MB	3,125	25	>100
MC	>100	>100	>100

Exemplo 8

Ensaio de Transglicosilase

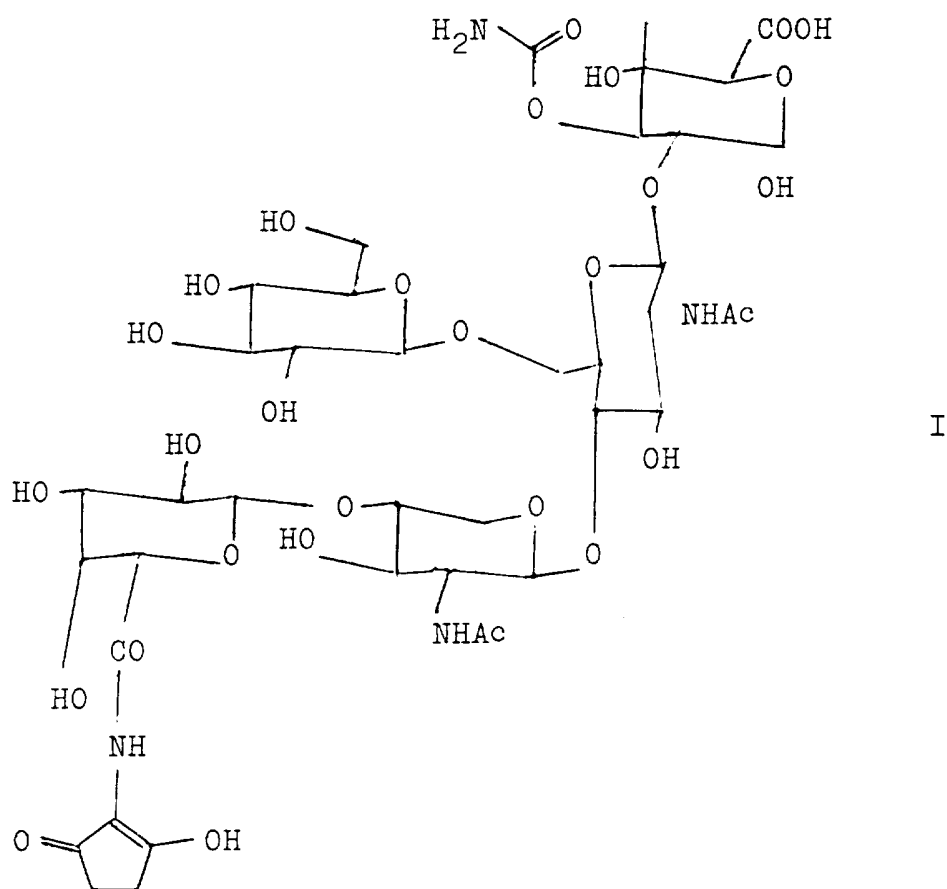
Realizou-se a inibição da polimerização das cadeias de açúcar de peptidoglicano pelos produtos da separação, de acordo com o ensaio descrito por Izaki (J. Biol. Chem. 243, 3180 - 3192, 1968) com intermediários de lípidos da membrana das células de E. coli K 12.

Este ensaio mostra que a moenomicina A (20 microgramas/mililitro) inibe a reacção de transglicosilase em 52,7% e o produto de separação MB inibe a enzima em 32,9%.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação do composto de degradação microbiológico de moenomicina da fórmula I



MC

caracterizado pelo facto de se incubar moenomicina A com o microorganismo da Colecção Alemã de Microorganismos *Bacillus spec.* DSM 4675 ou com um isolato enzimático dele extraído.

- 2ª -

Processo para a preparação de com-

postos de fórmula geral II



na qual

R^1 é hidrogénio ou um grupo fosfono e

R^2 é um grupo alquilo de cadeia ramificada ou não ramificada, saturado ou não saturado em $\text{C}_5\text{-C}_{55}$, caracterizado pelo facto de se incubarem antibióticos de fosfoglicolípidos com o microorganismo *Bacillus spec.* DSM 4675 ou com um isolato enzimático dele extraído.

- 3ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se incubar a um valor de pH compreendido entre 5,5 e 8,5.

- 4ª -

Processo para a preparação de moenomicinase caracterizável por

- decompor os antibióticos de fosfoglicolípidos na ligação fosfoglicosídica,
- um valor óptimo de pH de 8,0 a 8,5,
- uma temperatura óptima de 45 a 55° C e
- um valor de K_m de 4 a 10 micromolar relativamente à moenomycin A como substrato, caracterizado pelo facto de se cultivar o microorganismo *Bacillus spec.* DSM 4675.

A requerente reivindica a prioridade
do pedido alemão apresentado em 20 de Agosto de 1988, sob o
nº. P 38 28 337.9.

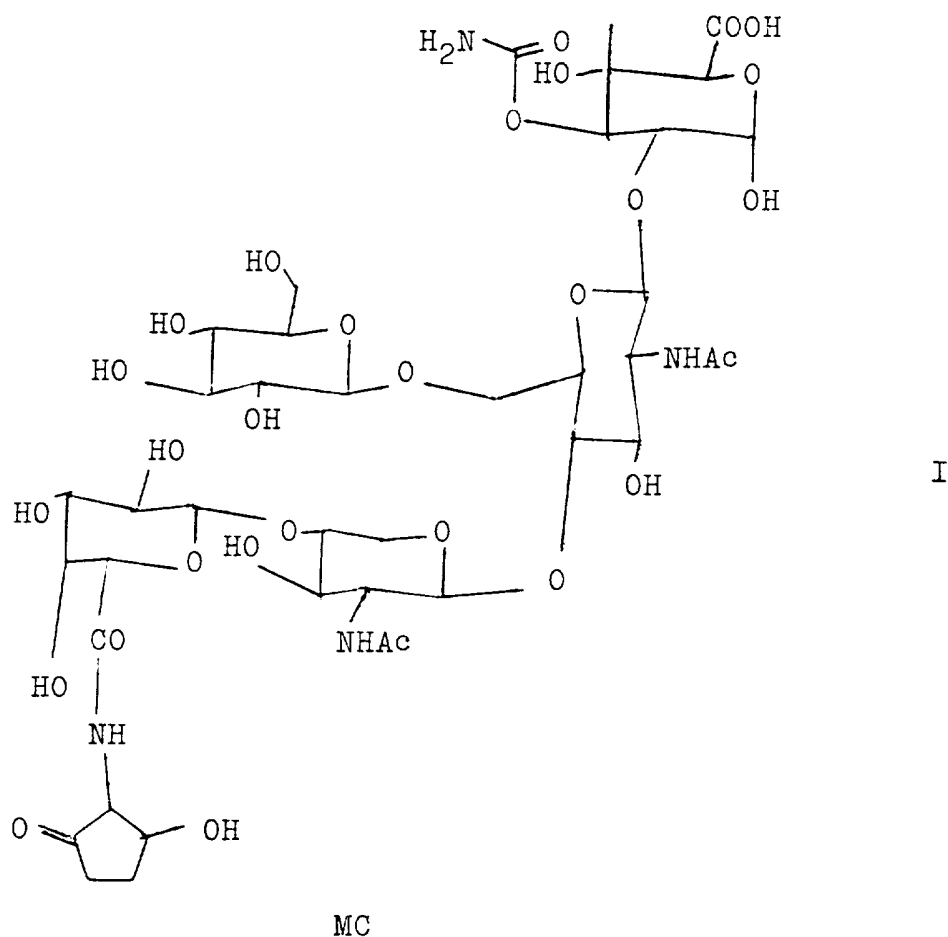
Lisboa, 17 de Agosto de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MOENOMICINA"

A invenção refere-se a um processo para a preparação do composto de degradação microbiológico de moenomicina da fórmula I



que compreende incubar-se moenomicina A com o microorganismo da Colecção Alemã de Microorganismos Bacillus spec. DSM 4675 ou com um isolato enzimático dele extraído.