

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98134

REQUERENTE: FUJISAVA PHARMACEUTICAL CO., LTD., Japonesa, industrial e comercial, estabelecida em 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-Ku, Osaka-shi, OSAKA 541, Japão.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MONO- OU DISSULFATO DO PRODUTO (WS7622A) OBTIDO DA CULTURA DE UMA ESTIRPE DE STREPTOMYCES RESISTOMYCIFICUS No. 7622 E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÉM"

INVENTORES: SHIGEHIRO TAKASE E MASAKUNI OKUHARA

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

Grã-Bretanha, 29 de Junho de 1990, sob o nº 9014546.7.

Descrição referente à patente de invenção de FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD., japonesa, industrial e comercial, com sede em 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-Ku, Osaka-shi, OSAKA 541, Japão, (inventores: Shigehiro Takase e Masakuni Okuhara, residentes no Japão), "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MONO- OU DISSULFATO DO PRODUTO (WS7622A) OBTIDO DA CULTURA DE UMA ESTIRPE DE STREPTOMYCES RESISTOMYCIFICUS No 7622 E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÉM"

DESCRIÇÃO

Esta invenção refere-se a um processo para a preparação de novos mono- ou dissulfato do produto (WS7622a) obtido da cultura de uma estirpe de Streptomyces resistomycificus No 7622.

Mais particularmente, esta invenção refere-se a um processo para a preparação de novos mono- ou dissulfato de WS7622A e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis que

têm uma actividade inibidora da elastase de leucócitos humanos, e de uma composição farmacêutica que os contém referindo ainda um processo para a sua utilização.

Os inventores desta invenção prepararam anteriormente a substância WS7622A que é utilizada como material de partida nesta invenção, por cultura de uma estirpe de Streptomyces resistomycificus No. 7622 num meio nutriente e apresentaram o presente pedido de patente cobrindo a substância em vários países (conforme o Pedido de Patente Europeia No 90104500.5). A Streptomyces resistomycificus No. 7622 foi depositada na "International Deposit Area Authority" de acordo com o Tratado de Budapeste, no "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology" (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japão segundo o número de acesso FERM BP-2306 (data de depósito : 23 de Fevereiro de 1989).

A substância WS7622A é, contudo, insolúvel em água e assim os inventores dessa invenção estudaram um aumento da solubilidade da substância WS7622A em água e assim eles conseguiram aumentar a solubilidade de WS7622A em água por sulfatação da substância WS7622A.

O mono- ou dissulfato de WS7622A e o seu sal farmacêuticamente aceitável desta invenção pode ser preparado por sulfatação da substância WS7622A ou do seu sal.

O material da partida, que é a substância

WS7622A é o novo composto e possui as seguintes propriedades físico-químicas.

Propriedades físico-químicas de substância WS7622A :

Aparência : prisma incolor

Natureza da substância : acídica

Reacção de cor : positiva;

sulfato de cério, vapor de iodo negativo;

ninidrina, Molish

Solubilidade : solúvel;

metanol, etanol, n-butanol pouco solúvel;

clorofórmio, acetona, acetato de etilo insolúvel;

água, n-hexano

Cromatografia de Camada Fina (TLC) :

clorofórmio-metanol (5:1, v/v) Rf 0,51

acetona-metanol (10:1) 0,62

(placa de Kiesel gel 60 F254 sílica gel, Merck)

Ponto de fusão : 250-252°C (dec.)

Rotação específica : $[\alpha]_D^{23} + (C=1,0, \text{metanol})$

Espectro UV : MeOH 287nm (e=3600)

λ
máx

MeOH-HCl 287nm

λ
máx

MeOH-NaOH 298nm



λ máx

Fórmula molecular : $C_{47}H_{63}N_9O_{13}$

Análise elementar :

calc. ($C_{47}H_{63}N_9O_{13} \cdot 2H_2O$): C 56,56, H 6,77, N 12,63 %

determ. ; C 56,65, H 6,62, N 12,27 %

Peso molecular : FAB-MS m/z 984 (M+Na)⁺


Espectro de absorção de infravermelhos :

KBr 3400, 3300, 3060, 2980, 2940, 1735, 1710,
} máx 1690, 1670, 1660, 1640, 1540, 1520, 1470,
1380, 1330, 1300, 1260, 1220, 1200, 1160,
1130, 1090, 1000, 980, 940, 920 cm^{-1}

Espectro de ressonância magnética nuclear 1H :

(400MHz, CD_3OD) δ

7,22-7,09	(3H, m)
6,88-6,77	(3H, m)
6,74	(1H, s)
6,46	(1H, s)
5,46	(1H, m)
5,18	(1H, s)
4,85	(1H, s)
4,77	(1H, m)
4,65	(1H, m)
4,50	(1H, m)
3,96	(1H, m)
3,91	(1H, d, J=9Hz)
3,60-3,47	(2H, m)
3,03	(1H, m)




2,90	(3H, s)
2,86	(1H, m)
2,59-2,49	(2H, m)
2,39	(1H, m)
2,29-2,16	(2H, m)
2,00	(1H, m)
1,84	(1H, m)
1,74	(3H, d, j=6Hz)
1,72-1,53	(4H, m)
1,44	(3H, d, j=6Hz)
1,12	(1H, m)
1,10	(6H, d, j=6Hz)
0,99	(3H, d, j=6Hz)
0,94	(3H, d, j=6Hz)


Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C :

(100MHz, CD_3OD) δ

179,7	(s)
176,3	(s)
174,7	(s)
173,3	(s)
172,4	(s)
171,4	(s)
170,3	(s)
165,8	(s)
160,2	(s)
145,7	(s)
145,6	(s)



137,5	(s)
134,0	(d)
131,4	(s)
130,6	(d) x 2
129,8	(s)
129,1	(d) x 2
129,1	(s)
127,6	(d)
119,1	(d)
118,0	(d)
76,0	(d)
73,4	(d)
63,1	(d)
61,4	(d)
57,1	(d)
53,6	(d)
52,7	(d)
50,5	(d)
39,9	(t)
36,1	(t)
35,8	(d)
31,8	(q)
31,0	(t)
30,8	(d)
29,9	(t)
29,7	(t)
25,2	(t)

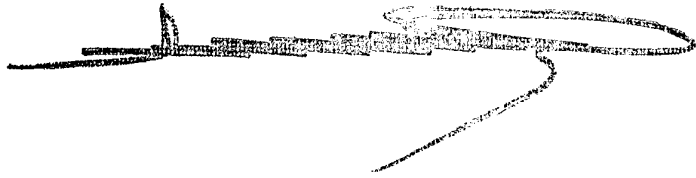


Um sal de WS7622A pode incluir um sal obtido com uma base inorgânica ou orgânica como por exemplo um sal de metal alcalino (por exemplo sal de sódio, sal de potássio, etc.), um sal de metal alcalino-terroso (por exemplo sal de cálcio, etc.), sal de amónio, sal de etanolamina, sal de trietilamina, sal de dicitclohexilamina ou produtos semelhantes.

Os agentes de sulfatação adequados para serem utilizados para a preparação de mono- e dissulfato de WS7622A e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis desta invenção são o ácido clorossulfónico, o ácido sulfâmico, uma combinação de dicitclohexilcarbodiimida e ácido sulfúrico, uma combinação de dicitclohexilcarbodiimida e hidrogenossulfato de tetrabutílamónio, aduto de trióxido de enxofre como por exemplo, complexo de trióxido de enxofre e piridina, complexo de trióxido de enxofre e trimetilamina, complexo de trióxido de enxofre e trietilamina, complexo de trióxido de enxofre e dioxano, complexo de trióxido de enxofre e dimetilnilina ou produtos semelhantes.

A reacção é habitualmente efectuada num solvente convencional tal como o cloreto de metileno, clorofórmio, benzeno, tolueno, piridina, éter dietílico, dioxano, tetrahidrofurano, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, N,N-dimetilformamida ou qualquer outro solvente orgânico que não afecte prejudicialmente a reacção.

A temperatura da reacção não é crítica e a reacção pode ser efectuada com arrefecimento, à temperatura



ambiente ou com aquecimento.

Esta reacção deve ser preferivelmente efectuada na presença de uma base. Uma base adequada pode ser uma base inorgânica tal como um hidróxido de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso (por exemplo hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, etc.), bicarbonato de metal alcalino (por exemplo bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio, etc.), um carbonato de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso (carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de cálcio, etc.), um fosfato de metal alcalino (por exemplo dihidrogenofosfato de sódio, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de dissódio, hidrogenofosfato de dipotássio, etc.), ou uma base orgânica tal como um alcóxido de metal alcalino (por exemplo metóxido de sódio, etóxido de potássio, etc.), amina (por exemplo trietilamina, piridina, lutidina, etc.).

O mono- ou dissulfato de WS7622A e o seu sal farmacêuticamente aceitável são o novo composto e entre eles, o sal de di-sódio de dissulfato de WS7622A e o sal de di-potássio de dissulfato de WS7622A têm as seguintes propriedades físico-químicas, respectivamente:

Sal de di-sódio de dissulfato de WS7622A :

Aparência : cristais incolores

Solubilidade : solúvel;

água, metanol

insolúvel;

clorofórmio, n-hexano

Ponto de fusão : 257-263°C (dec.)
Rotação específica : $[\alpha]_D^{23} + 37,5^\circ$ (C=1,0, metanol)
Fórmula molecular : $C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2Na_2$
Análise elementar :

calc. ($C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2Na_2 \cdot 6H_2O$);

C 44,30, H 5,77, N 9,89, S 5,03, Na 3,61 %

determ. : C 44,98, H 5,90, N 10,66, S 5,00, Na 3,98 %

Peso molecular : FAB-MS m/z 1188 (M+Na)⁺

Cromatografia de Camada Fina :

<u>Fase estacionária</u>	<u>Solvente de revelação</u>	<u>Valor Rf</u>
gel de sílica (Merck Art 5715)	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (65 : 25 : 4)	0,11
	n-butanol-ácido acético-água (4 : 2 : 1)	0,29

Espectro de absorção de infravermelhos (anexo à Fig. 1) :

KBr 3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
máx 1500, 1380, 1250, 1200, 1060, 1030,
940, 890 cm⁻¹

Espectro de ressonância magnética nuclear ¹H (anexo à Fig. 2) :

(400MHz, D₂O) δ

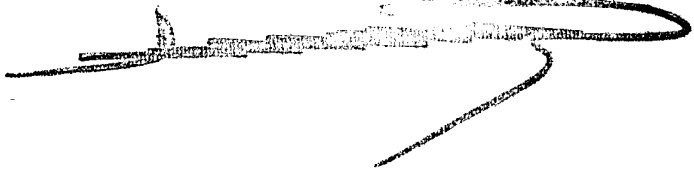
7,50	(1H, s)
7,27	(1H, s)
7,33-7,24	(3H, m)
6,94	(1H, q, J=7Hz)
6,85	(2H, br d, J=8Hz)



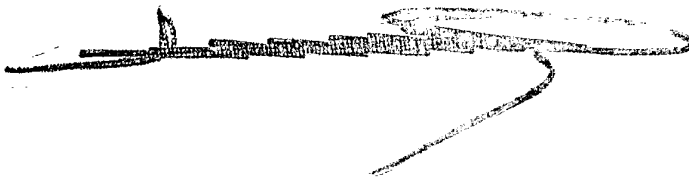
5,53	(1H, m)
5,37	(1H, m)
4,80	(1H, br s)
4,63-4,57	(2H, m)
4,53	(1H, m)
4,06	(1H, m)
3,99	(1H, d, J=10Hz)
3,56	(1H, br d, J=14Hz)
3,46	(1H, m)
2,97	(3H, s)
2,97-2,88	(2H, m)
2,72	(1H, m)
2,59	(1H, m)
2,51-2,38	(2H, m)
2,09-1,91	(4H, m)
1,82-1,60	(3H, m)
1,77	(3H, d, j=7Hz)
1,50	(3H, d, j=6,5Hz)
1,40	(1H, m)
1,11	(6H, d, j=7Hz)
0,99	(3H, d, j=6,5Hz)
0,97	(3H, d, j=6,5Hz)

Espectro de ressonância magnética nuclear ¹³C (anexo à Fig. 3) :

(100MHz, D ₂ O)	δ
183,6	(s)
177,9	(s)



177,7	(s)	
174,8	(s)	
173,8	(s)	
173,3	(s)	
172,4	(s)	
167,8	(s)	
161,5	(s)	
145,5	(s)	
144,9	(s)	
139,6	(d)	
139,0	(s)	
137,0	(s)	
136,0	(s)	
132,3	(d)	x 2
131,0	(d)	x 2
129,6	(d)	
127,4	(d)	
125,9	(d)	
77,4	(d)	
75,1	(d)	
63,8	(d)	
62,7	(d)	
59,1	(d)	
55,9	(d)	
54,9	(d)	
51,9	(d)	
41,9	(t)	



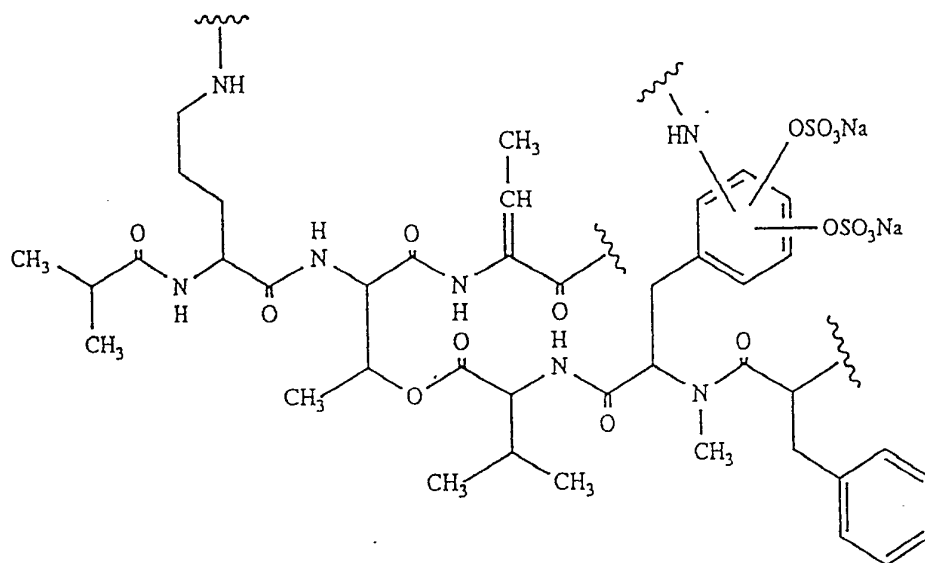
37,2	(d)
36,9	(t)
34,1	(q)
32,3	(d)
31,9	(t)
31,8	(t)
31,2	(t)
27,5	(t)
23,7	(t)
21,7	(q)
21,4	(q) x 2
21,3	(q)
21,1	(q)
15,5	(q)

Análise de amino-ácidos:

O sal de di-sódio do dissulfato de WS7622A (1 mg) foi hidrolisado com HCl (1 ml) a 110°C durante 20 horas e a mistura foi evaporada à secura. A mistura obtida foi analisada num analisador automático de amino-ácidos modelo Hitachi 835. A solução padrão de amino-ácidos [Tipo H (Wako Chemicals 013-08391) e Tipo B (Wako Chemicals 016-08641)] foram utilizadas como referência.

Como resultado deste ensaio foram detectados a treonina, valina, fenilalanina, ornitina, NH₃ e componentes desconhecidos positivos à ninidrina.

A estrutura química parcial do sal de di-sódio de dissulfato de WS7622A proposta é a seguinte:



Sal de di-potássio de dissulfato de WS7622A :

Aparência : pó amorfo incolor

Solubilidade : solúvel;

água, metanol

insolúvel;

clorofórmio, n-hexano

Ponto de fusão : 230-237°C (dec.)

Rotação específica : $[\alpha]_D^{23} + 34^\circ$ (C=1,0, metanol)

Fórmula molecular : $C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2K_2$

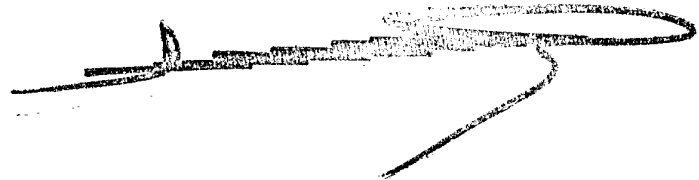
Análise elementar :

calc. ($C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2K_2 \cdot 6H_2O$);

C 43,21, H 5,63, N 9,65, S 4,91, K 5,99 %

determ. : C 43,96, H 5,44, N 9,97, S 5,09, K 4,49 %

Peso molecular : FAB-MS m/z 1236 (M+K)⁺



Cromatografia de Camada Fina :

<u>Fase estacionária</u>	<u>Solvente de revelação</u>	<u>Valor Rf</u>
gel de sílica (Merck Art 5715)	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (65 : 25 : 4)	0,13

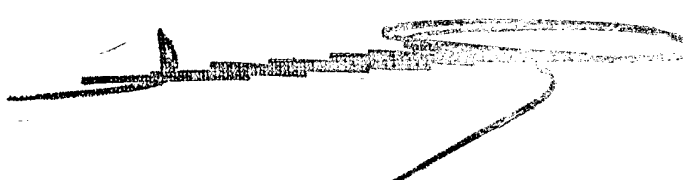
Espectro de absorção de infravermelhos (anexo à Fig. 4) :

KBr 3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
máx 1500, 1405, 1380, 1250, 1200, 1050,
1030, 940, 890 cm⁻¹

Espectro de ressonância magnética nuclear ¹H (anexo à Fig.

5) :

(400MHz, D ₂ O)	δ
7,52	(1H, s)
7,28	(1H, s)
7,34-7,25	(3H, m)
6,96	(1H, q, J=7Hz)
6,87	(2H, br d, J=8Hz)
5,56	(1H, m)
5,40	(1H, m)
4,84	(1H, br s)
4,70-4,55	(3H, m)
4,10	(1H, m)
4,03	(1H, m)
3,60	(1H, br d, J=14Hz)
3,50	(1H, m)
3,00	(3H, s)
3,00-2,85	(2H, m)
2,76	(1H, m)



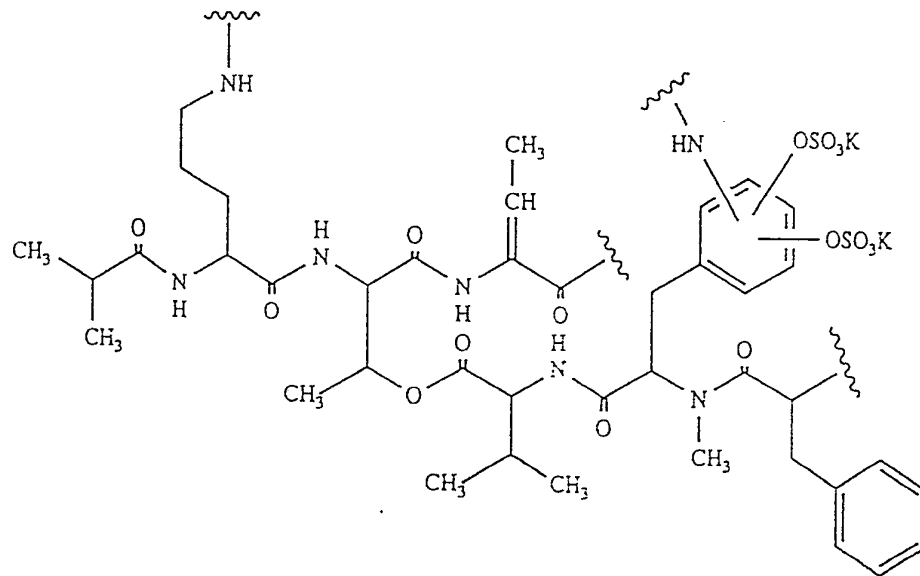
2,62	(1H, m)
2,55-2,40	(2H, m)
2,12-1,95	(4H, m)
1,90-1,65	(3H, m)
1,79	(3H, d, j=7Hz)
1,53	(3H, d, j=6,5Hz)
1,45	(1H, m)
1,14	(6H, d, j=7Hz)
1,02	(3H, d, j=6,5Hz)
1,00	(3H, d, j=6,5Hz)

Análise de amino-ácidos:

O sal de di-potássio de dissulfato de WS7622A (1 mg) foi hidrolisado com HCl 6N (1 ml) à temperatura de 110°C durante 20 horas e a mistura foi evaporada à secura. A mistura obtida foi analisada num analisador automático de amino-ácidos modelo Hitachi 835. A solução padrão de amino-ácidos [Tipo H (Wako Chemicals 013-08391) e Tipo B (Wako Chemicals 016-08641)] foram utilizadas como referência.

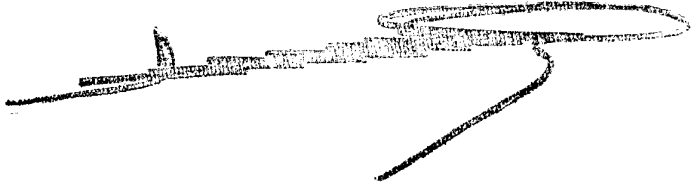
Como resultado deste ensaio foram detectadas a treonina, valina, fenilalanina, ornitina, NH₃ e componentes desconhecidos positivos à ninidrina.

A estrutura química parcial do sal de di-potássio de dissulfato de WS7622A proposta é a seguinte:



Um sal farmacologicamente aceitável de mono- ou dissulfato de WS7622A pode incluir um mono- ou dissal obtido com uma base inorgânica ou orgânica como por exemplo um sal de metal alcalino (por exemplo sal de sódio, sal de potássio, etc.), sal de metal alcalino-terroso (por exemplo sal de cálcio, etc.), sal de amônio, sal de etanolamina, sal de trietilamina, sal de diciclohexilamina, sal de piridina ou produtos semelhantes.

O mono- ou dissulfato de WS7622A e os seus sais farmacologicamente aceitáveis têm uma actividade inibidora da elastase dos leucócitos humanos e são úteis como inibidores da elastase de leucócitos humanos para o tratamento ou prevenção de doenças degenerativas, por exemplo enfisema pulmonar, aterosclerose, artrite



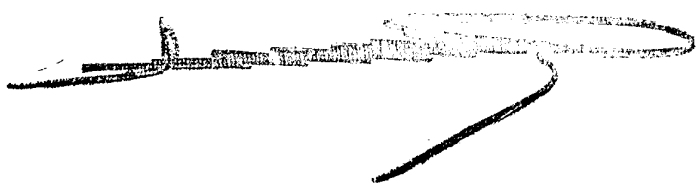
reumatóide, osteoartrite, psoríase, pancreatite, síndrome das perturbações respiratórias adultas, fibrose cística, bronquite crónica, bronquiectasia e doenças semelhantes e ainda é útil para o tratamento ou prevenção da asma, rejeição de enxertos, nefrite e sepsis.

Para ilustrar a utilidade do mono- ou dissulfato de WS7622A e dos seus sais farmacologicamente aceitáveis são apresentados em seguida dados obtidos dos ensaios farmacológicos..

1. Ensaio de Inibição de Protease

(1) Método:

O tampão utilizado neste ensaio foi o HEPES 0,1M (ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazino-N'-(2-etanossulfónico) contendo NaCl 0,5M, pH 7,5. Foram diluídos vinte e cinco microlitros de metoxisuccinil-(Ala)₂-Pro-Val-p-nitroanilido 2 mM (100 mM de solução de sulfóxido de dimetilo diluída no tampão) e foram misturados 50 ul de amostra (10 ul de amostra em solvente orgânico dissolvidos 5 vezes no tampão) em furos de uma placa de microtitulação com 96 furos. Foi medida a absorvância da mistura com o comprimento da onda de 415 nm por meio de um leitor de microplacas (Corona Electric Co., Iwakari, Japão). Após a medida, colocaram-se em repouso 25 ul de elastase de esputo humano (HSE) 6 ug/ml durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi medida a absorvância a 415 nm. A percentagem de inibição pelo medicamento foi determinada de $100 \times (1 - \frac{r}{r_0})$ (r de inibidor presente/r de inibidor ausente),



em que "r" é a absorvância após 30 minutos de incubação menos a absorvância antes da adição da enzima. Os efeitos dos inibidores contra as outras proteases foram determinados de forma semelhante utilizando o N-succinil-(Ala)₃-p-nitroanilido para a elastase da pancrease de porcos (Tipo IV, 5 ug/ml final), N-alfa-benzoil-Arg-p-nitroanilido para a tripsina de pâncreas de bovino (Tipo I, 16 ug/ml final), metoxisuccinil-(Ala)₂-Pro-Met-p-nitroanilido para quimiotripsina de pâncreas de bovino (Tipo II, 1,5 ug/ml final). Os HSE foram obtidos de Elastin Products Company Inc., MO, Estados Unidos da América. Todos os outros substratos e proteases foram adquiridos de Sigma Chemicals Co.

(2) Resultados obtidos:

Efeito inibidor de sal de dissódio de dissulfato de WS7622A e sal de dipotássio de dissulfato de WS7622A em várias actividades de proteases de serina.

IC₅₀ (M)

substância	Elastase de esputo humano (M)	Elastase de pâncreas de porcos	Tripsina (bovino)	Quimio- tripsina (bovino)
Sal de di-sódio de dissulfato de WS7622A	3,5x10 ⁻⁸	4,9x10 ⁻⁸	1,8x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁷

Sal de di-potássio

de dissulfato $5,9 \times 10^{-8}$ $4,9 \times 10^{-8}$ $2,9 \times 10^{-4}$ $2,0 \times 10^{-7}$
de WS7622A

Cada valor foi expresso como 50% de concentração inibidora (IC_{50}).

2. Determinação da actividade em danos de pulmões induzidos por elastase:

(1) Método:

Foram utilizadas Hamsters com anestesia de pentobarbital. Foi introduzida solução salina ou elastase de esputo humano contendo solução salina de forma intratraqueal através de uma pequena incisão na região ventral da garganta utilizando seringas de 1 ml com uma agulha de calibre 27. Passado 3 horas, os animais foram sacrificados por asfixiação com CO_2 e foi reexposta a traqueia de cada animal. Os pulmões foram em seguida lavados utilizando uma alíquota de 2,5 ml de solução salina e em seguida retirada a solução salina, obtendo-se um volume final de aproximadamente 1,5 ml de lavagem broncoalveolar (BAL) de fluido de cada animal.

As células do fluido BAL foram recolhidas por centrifugação e foram em seguida diluídas com água destilada para rompimento e o teor de hemoglobina foi determinado de forma espectrofotométrica a 541 nm.

Os medicamentos de ensaio foram dissolvidos em solução salina e administrados de forma intratraqueal de forma idêntica à utilizada para administrar a elastase, a 5

minutos antes da administração de elastase.

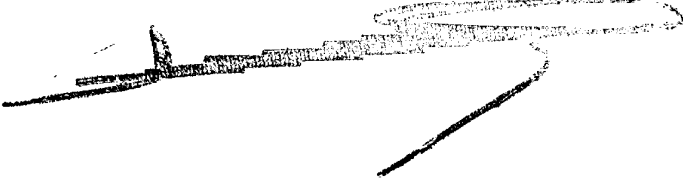
(2) Resultados Obtidos:

Efeito inibidor na hemorragia do pulmão induzida por elastase:

Composto de ensaio	pré-dose de 5 min (ug/local)	Hemorragia (OD 541 nm)	% inibição
Normal	-	0,31+0,12	-
Controlo	-	29,35+2,9	-
Sal de di-sódio de dissulfato de WS7622A	1	19,06+1,40*	35,4
	10	9,75+4,82*	67,5
	100	0,28+0,05***	100,1
Sal de di-potássio de dissulfato de WS7622A	1	19,71+1,20*	33,2
	10	10,73+1,20**	64,1
	100	0,35+0,16***	99,9

*p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001 comparados com o grupo de controlo (teste de Student t)

As composições farmacêuticas desta invenção podem ser utilizadas nas formas farmacêuticas convencionais como por exemplo injeções, inalações, pós, grânulos finos, grânulos, comprimidos, drageias, microcápsulas, cápsulas, supositórios, soluções, suspensões, xaropes de emulsões e




produtos semelhantes. Se desejado, podem ser adicionados à composição diluentes ou desintegrantes (por exemplo sacarose, lactose, amido, celulose cristalina, hidroxipropil celulose pouco substituída, silicato de alumínio sintético, etc.), agentes de ligação (por exemplo celulose, metilcelulose), hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, polipropilpirrolidona, polivinilpirrolidona, gelatina, goma arábica, polietilenoglicol, etc.), agentes corantes, agentes edulcorantes, lubrificantes (por exemplo estearato de magnésio, etc.), produtos semelhantes.

A dosagem da referida composição desta invenção depende da idade do paciente, peso corporal, condição, etc., e é geralmente administrada por via oral com um nível de dosagem diária de 100 mg a 10 g do composto pretendido ou do seu sal farmacologicamente aceitável, para se obter 1 g a 5 g na mesma base, com o intervalo de 1 a 3 vezes ao dia. As doses unitárias típicas podem ser de 50 mg, 100 mg, 200 mg, 500 mg, 1 g e doses semelhantes, embora estes valores sejam apenas exemplos e não sejam obviamente limitativos.

Os seguintes Exemplos são apresentados para ilustração desta invenção.

Exemplo 1

Num frasco redondo de três bocas de 300 ml foram colocados o complexo de trióxido de enxofre e trimetilamina (13,9 g, Aldrich), carbonato de potássio anidro (6,9 g) e a




substância WS7622A (10 g), e foi adicionada dimetilformamida anidra (50 ml) à mistura e vigorosamente agitada à temperatura ambiente durante a noite.

A mistura foi evaporada à secura a pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em gelo-água (300 ml) e carregado numa coluna de HP20ss (9.6 x 25 cm). A coluna foi lavada com água (10 l) e eluída com MeOH-H₂O (4:6) (2 l). As fracções do produto foram recolhidas e evaporadas à secura para se obter um pó. O pó foi dissolvido em H₂O (70 ml) e esta solução foi passada através de uma coluna de AG50W-X4 (forma Na⁺, 4 x 32 cm, Bio-Rad Laboratories) e evaporada à secura. O pó obtido (11,2 g) foi recristalizado de etanol quente (50 ml) para se obterem 10,6 g de sal de dissódio de dissulfato de WS7622A como cristais incolores.

Exemplo 2:

Num frasco de fundo redondo de três bocas de 300 ml foram colocados o complexo de trióxido de enxofre e trimetilamina (13,9 g, Aldrich), carbonato de potássio anidro (6,9 g) e a substância WS7622A (10 g), e foi adicionada dimetilformamida anidra (50 ml), e a mistura foi vigorosamente agitada durante à noite à temperatura ambiente.

A mistura foi evaporada à secura a pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em gelo-água (300 ml) e carregada numa coluna de HP20ss (9.6 x 25 cm). A coluna foi lavada com água e eluída com MeOH-H₂O (4:6) (2 l). As fracções do produto foram recolhidas e evaporadas à secura



para se obterem 11,8 g do sal de dipotássio de dissulfato de WS7622A como pó incolor.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de mono- ou dissulfato do produto (WS7622A) obtido da cultura de uma estirpe de Streptomyces resistomycificus No 7622 ou do seu sal, caracterizado por se sulfatar o WS7622A ou o seu sal na presença ou ausência de uma base para se obter o mono- ou dissulfato de WS7622A ou o seu sal.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se sulfatar o WS7622A ou o seu sal na presença de uma base para se obter o sal de di-metal alcalino do dissulfato de WS7622A.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2 caracterizado por o sal de di-metal alcalino do dissulfato de WS7622A ser o sal de di-sódio, que apresenta as seguintes propriedades físico-químicas:

Sal de di-sódio de dissulfato de WS7622A :

Aparência : cristais incoloros

Solubilidade : solúvel;

água, metanol



insolúvel;

clorofórmio, n-hexano

Ponto de fusão : 257-263°C (dec.)
 Rotação específica : $[\alpha]_D^{23} + 37,5^\circ$ (C=1,0, metanol)
 Fórmula molecular : $C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2Na_2$
 Análise elementar :

calc. ($C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2Na_2 \cdot 6H_2O$);

C 44,30, H 5,77, N 9,89, S 5,03, Na 3,61 %

determ. : C 44,98, H 5,90, N 10,66, S 5,00, Na 3,98 %

Peso molecular : FAB-MS m/z 1188 (M+Na)⁺

Cromatografia de Camada Fina :

<u>Fase estacionária</u>	<u>Solvente de revelação</u>	<u>Valor Rf</u>
gel de sílica (Merck Art 5715)	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (65 : 25 : 4)	0,11
	n-butanol-ácido acético-água (4 : 2 : 1)	0,29


Espectro de absorção de infravermelhos (anexo à Fig. 1) :

KBr 3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
 máx 1500, 1380, 1250, 1200, 1060, 1030,
 940, 890 cm⁻¹

Espectro de ressonância magnética nuclear ¹H (anexo à Fig.

2) :

(400MHz, D ₂ O)	δ	
7,50		(1H, s)
7,27		(1H, s)
7,33-7,24		(3H, m)
6,94		(1H, q, J=7Hz)



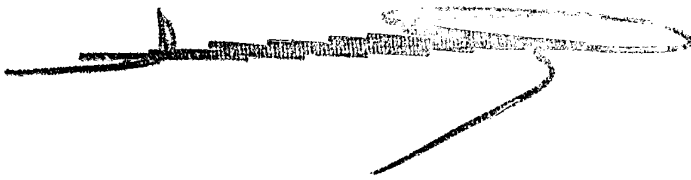
6,85	(2H, br d, J=8Hz)
5,53	(1H, m)
5,37	(1H, m)
4,80	(1H, br s)
4,63-4,57	(2H, m)
4,53	(1H, m)
4,06	(1H, m)
3,99	(1H, d, J=10Hz)
3,56	(1H, br d, J=14Hz)
3,46	(1H, m)
2,97	(3H, s)
2,97-2,88	(2H, m)
2,72	(1H, m)
2,59	(1H, m)
2,51-2,38	(2H, m)
2,09-1,91	(4H, m)
1,82-1,60	(3H, m)
1,77	(3H, d, j=7Hz)
1,50	(3H, d, j=6,5Hz)
1,40	(1H, m)
1,11	(6H, d, j=7Hz)
0,99	(3H, d, j=6,5Hz)
0,97	(3H, d, j=6,5Hz)

Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C (anexo à Fig.

3) :

(100MHz, D_2O) δ

183,6 (s)



177,9	(s)
177,7	(s)
174,8	(s)
173,8	(s)
173,3	(s)
172,4	(s)
167,8	(s)
161,5	(s)
145,5	(s)
144,9	(s)
139,6	(d)
139,0	(s)
137,0	(s)
136,0	(s)
132,3	(d) x 2
131,0	(d) x 2
129,6	(d)
127,4	(d)
125,9	(d)
77,4	(d)
75,1	(d)
63,8	(d)
62,7	(d)
59,1	(d)
55,9	(d)
54,9	(d)
51,9	(d)



41,9	(t)
37,2	(d)
36,9	(t)
34,1	(q)
32,3	(d)
31,9	(t)
31,8	(t)
31,2	(t)
27,5	(t)
23,7	(t)
21,7	(q)
21,4	(q) x 2
21,3	(q)
21,1	(q)
15,5	(q)

Análise de aminoácidos:

Foi efectuada a hidrólise do dissulfato de di-sódio de WS7622A (1 mg) com HCl 6N (1 ml) a 110°C durante 20 horas e a mistura foi evaporada á secura. Foi analisada a mistura obtida num analisador automático de aminoácidos Hitachi 835. Foram utilizadas como soluções padrão de aminoácidos as soluções de Tipo H (Wako Chemicals 013-08391) e Tipo B (Wako Chemicals 016-08641).

Como resultado desse ensaio foram detectados os componentes treonina, valina, fenilalanina, ornitina, NH₃ e componentes desconhecidos positivos á ninidrina.

~~CONFIDENTIAL~~

Processo de acordo com a reivindicação 2 caracterizado por o sal de di-metal alcalino do dissulfato de WS7622A ser o sal de di-potássio, que apresenta as seguintes propriedades físico-químicas:

Sal de di-potássio de dissulfato de WS7622A :

Aparência : pó amorfo incolor

Solubilidade : solúvel;

água, metanol

insolúvel;

clorofórmio, n-hexano

Ponto de fusão : 230-237°C (dec.)

Rotação específica : $[\alpha]_D^{23} + 34^\circ$ (C=1,0, metanol)

Fórmula molecular : $C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2K_2$

Análise elementar :

calc. ($C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2K_2 \cdot 6H_2O$);

C 43,21, H 5,63, N 9,65, S 4,91, K 5,99 %

determ. : C 43,96, H 5,44, N 9,97, S 5,09, K 4,49 %

Peso molecular : FAB-MS m/z 1236 (M+K)⁺

Cromatografia de Camada Fina :

<u>Fase estacionária</u>	<u>Solvente de revelação</u>	<u>Valor Rf</u>
gel de sílica (Merck Art 5715)	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (65 : 25 : 4)	0,13

Espectro de absorção de infravermelhos (anexo à Fig. 4) :

KBr 3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
→ máx 1500, 1405, 1380, 1250, 1200, 1050,
1030, 940, 890 cm⁻¹

Espectro de ressonância magnética nuclear ¹H (anexo à Fig.



5) :

(400MHz, D₂O)

8

7,52	(1H, s)
7,28	(1H, s)
7,34-7,25	(3H, m)
6,96	(1H, q, J=7Hz)
6,87	(2H, br d, J=8Hz)
5,56	(1H, m)
5,40	(1H, m)
4,84	(1H, br s)
4,70-4,55	(3H, m)
4,10	(1H, m)
4,03	(1H, m)
3,60	(1H, br d, J=14Hz)
3,50	(1H, m)
3,00	(3H, s)
3,00-2,85	(2H, m)
2,76	(1H, m)
2,62	(1H, m)
2,55-2,40	(2H, m)
2,12-1,95	(4H, m)
1,90-1,65	(3H, m)
1,79	(3H, d, j=7Hz)
1,53	(3H, d, j=6,5Hz)
1,45	(1H, m)
1,14	(6H, d, j=7Hz)
1,02	(3H, d, j=6,5Hz)



1,00

(3H, d, j=6,5Hz)

Análise de aminoácidos:

Foi efectuada a hidrólise do dissulfato de dipotássio de WS7622A (1 mg) com HCl 6N (1 ml) a 110°C durante 20 horas e a mistura foi evaporada á secura. Foi analisada a mistura obtida num analisador automático de aminoácidos Hitachi 835. Foram utilizadas como soluções padrão de aminoácidos as soluções de Tipo H (Wako Chemicals 013-08391) e Tipo B (Wako Chemicals 016-08641).

Como resultado desse ensaio foram detectados os componentes treonina, valina, fenilalanina, ornitina, NH₃ e componentes desconhecidos positivos á ninidrina.

- 5ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por se incorporar como ingrediente activo o mono- ou dissulfato de WS7622A quando preparado de acordo com a reivindicação 1 ou do seu sal farmacêuticamente aceitável em associação com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

- 6ª -

Processo para a preparação de um inibidor da elastase de leucócitos humanos caracterizado por se incorporar como ingrediente activo o mono- ou dissulfato de

- 31 -

WS7622A quando preparado de acordo com a reivindicação 1 ou do seu sal farmacêuticamente aceitável em associação com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

A requerente reivindica a prioridade do pedido britânico apresentado em 29 de Junho de 1990, sob o N.º 9014546.7.

Lisboa, 28 de Junho de 1991

.....

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping horizontal strokes and a long, sweeping tail that curves downwards and to the right.



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MONO- OU DISSULFATO DO PRODUTO (WS7622A) OBTIDO DA CULTURA DE UMA ESTIRPE DE STREPTOMYCES RESISTOMYCIFICUS No 7622 E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de mono- ou dissulfato do produto (WS7622A) obtido da cultura de uma estirpe de Streptomyces resistomycificus No 7622 de WS7622A ou do seu sal, que compreende sulfatar-se o WS7622A ou o seu sal na presença ou ausência de uma base para se obter o mono- ou dissulfato de WS7622A ou o seu sal.

-
-
-

*Espectro de absorção de infravermelho
do sal de di-sódio do sulfato de WS7622A*

FIG.1

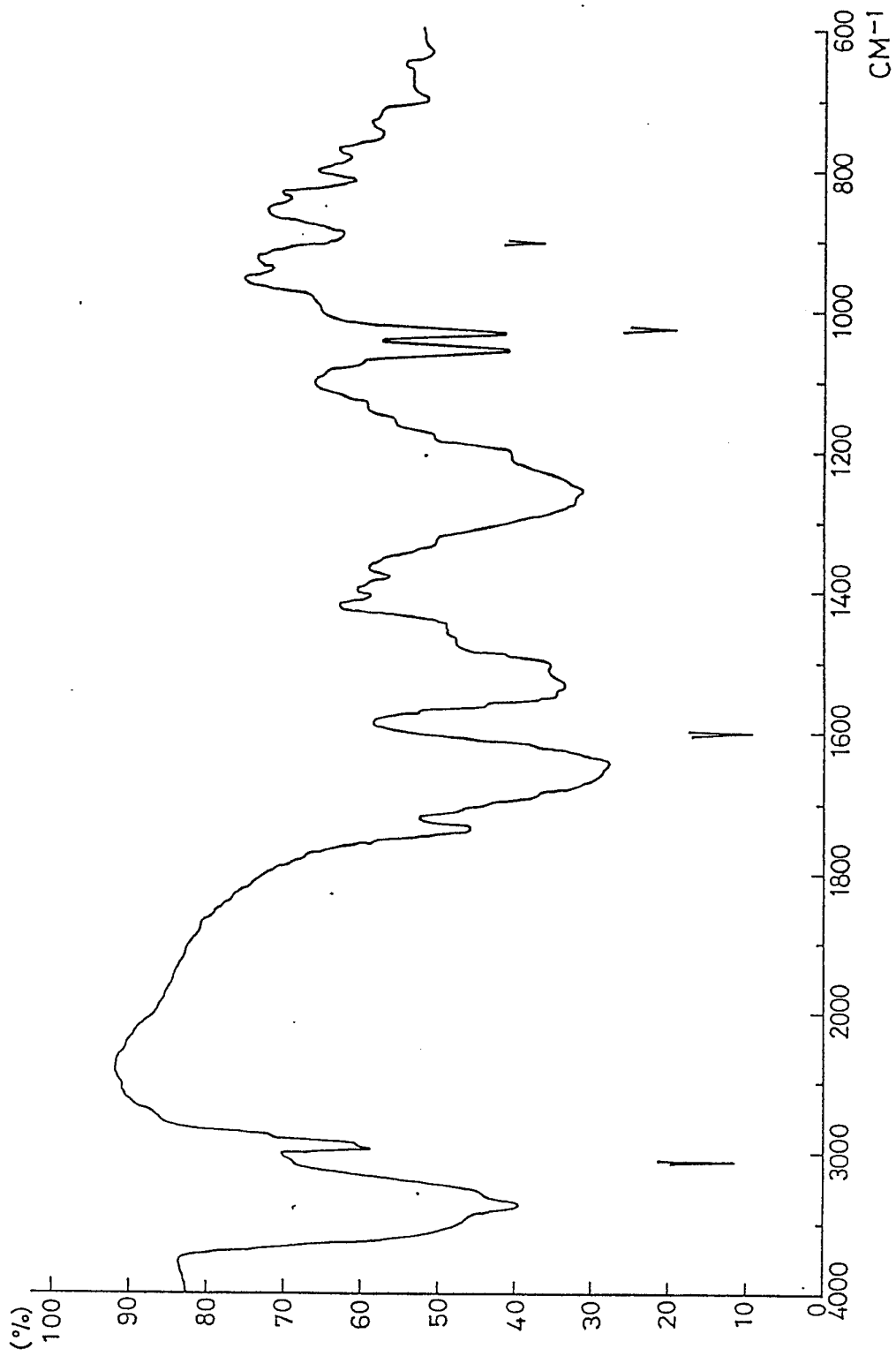


FIG. 2

Espectro de ressonância magnética nuclear
 ^1H do sal de di-sódio do di-sulfato de WS7622A

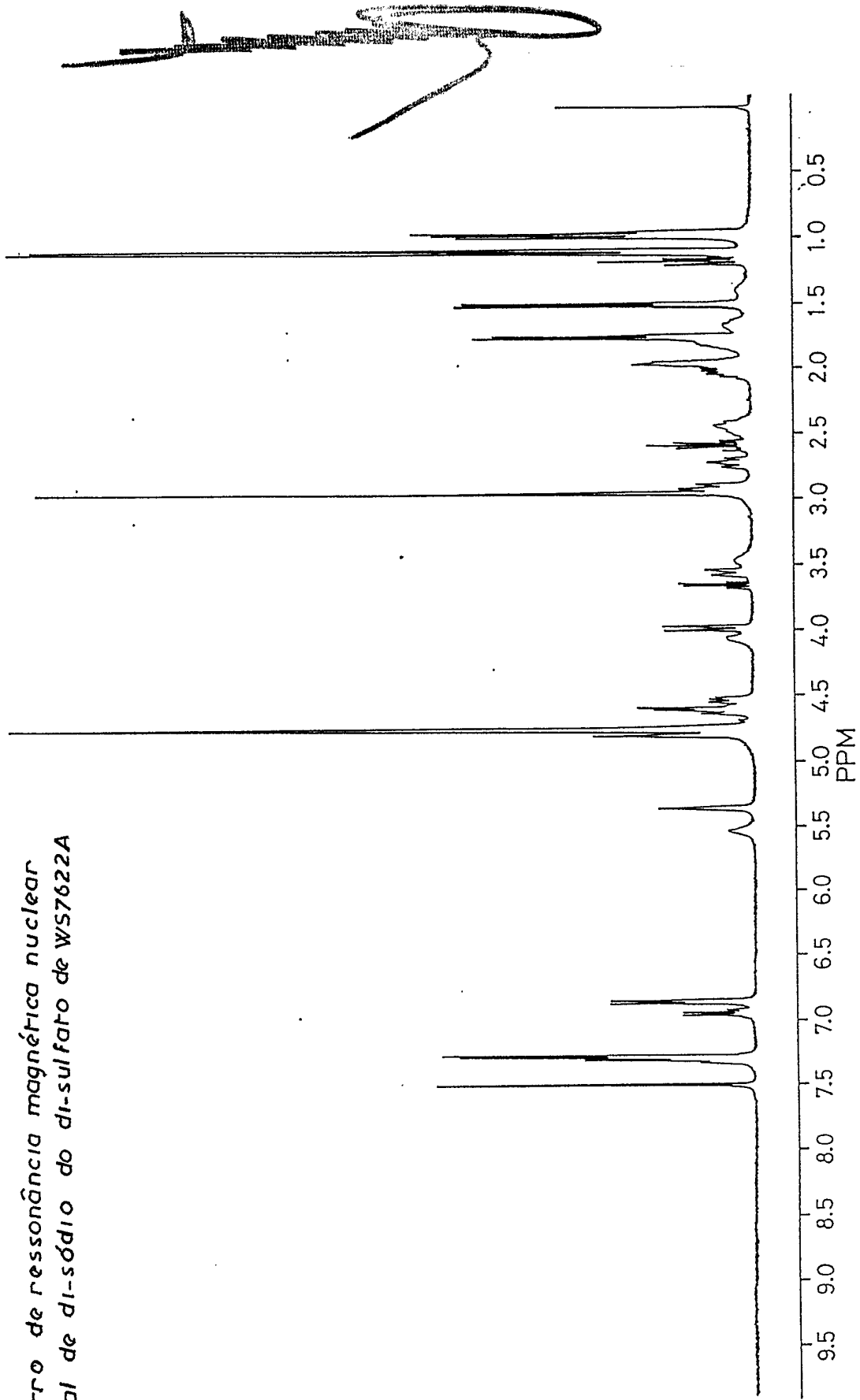


FIG.3

*Espectro de ressonância magnética nuclear
¹³C do sal de di-sódio do di-sulfato de WS 7622A .*

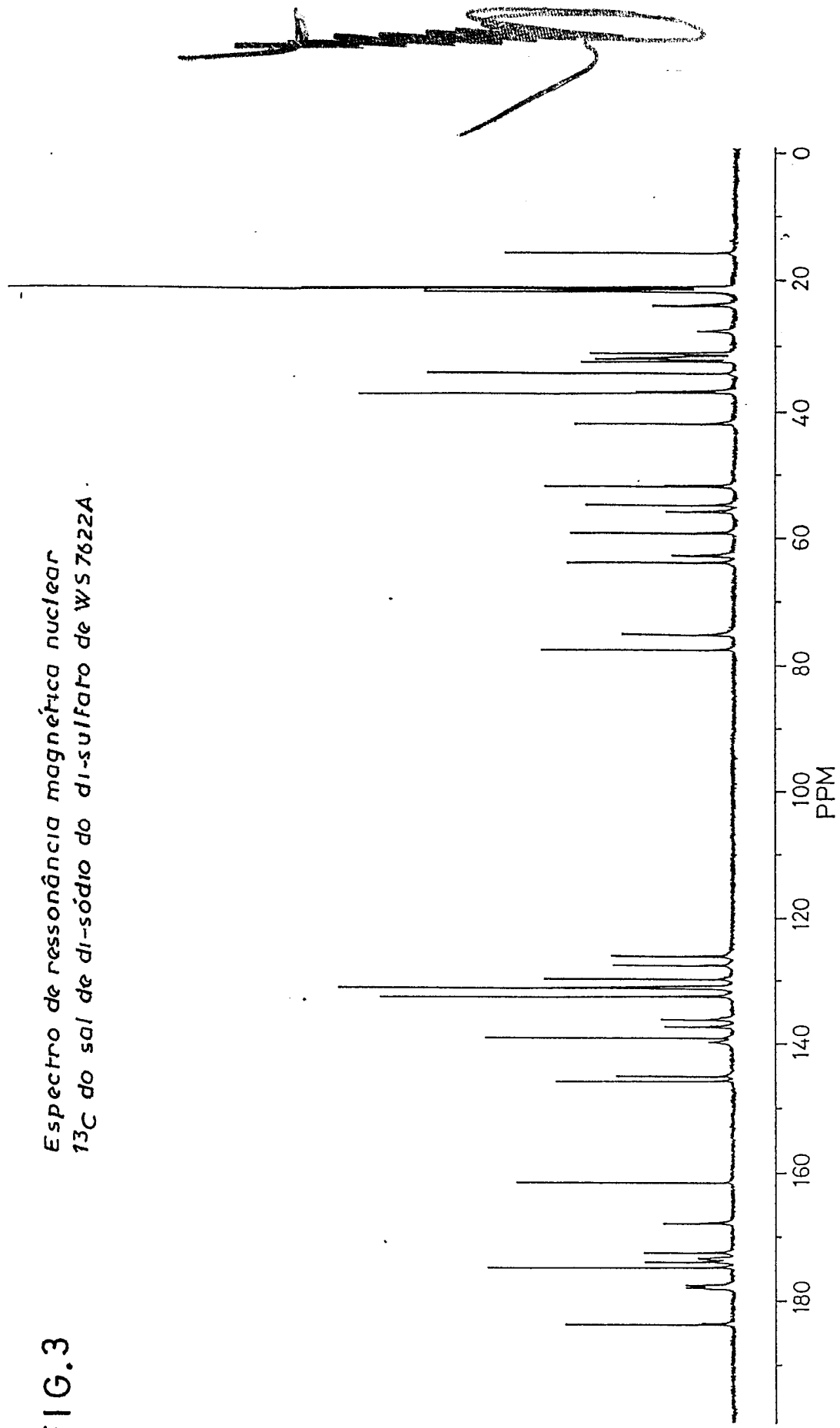


FIG. 4

*Espectro de absorção de infravermelho
do sal de di-sódio do sulfato de WS7622A*

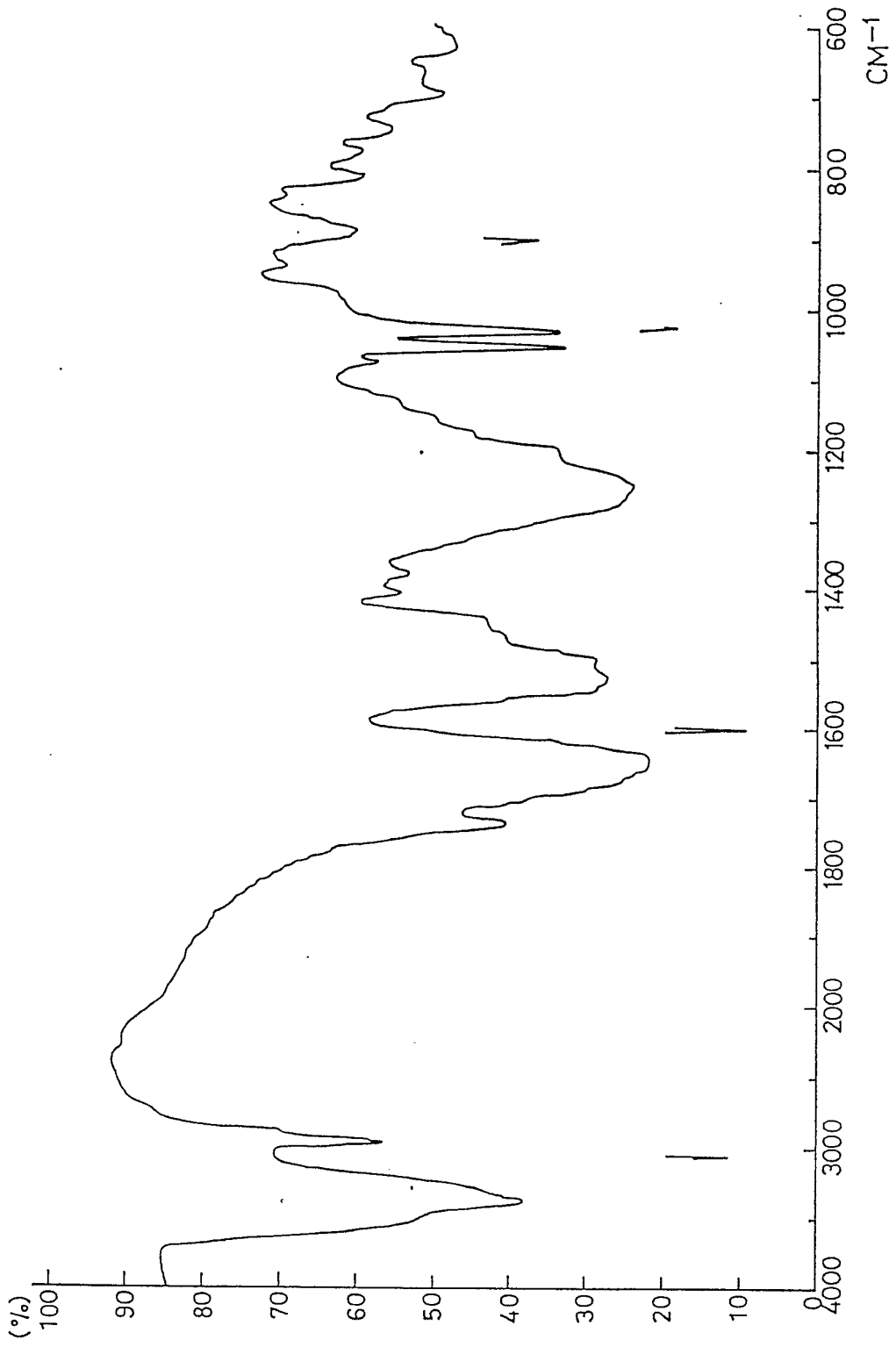


FIG. 5

Espectro de ressonância magnética nuclear
1H do sal de di-sódio do di-sulfato de WS7622A

