República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9803914-8 B1

(22) Data do Depósito: 15/10/1998

(45) Data de Concessão: 01/11/2016

(54) Título: COMPOSTOS LANTIBIÓTICOS RELACIONADOS A ACTAGARDINA, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS MESMOS E PRODUTO FARMACÊUTICO CONTENDO-OS

(51) Int.Cl.: C07K 4/04; C07K 7/08; C12P 1/04; C12R 1/045; A61K 38/10; A61P 31/04

(30) Prioridade Unionista: 15/10/1997 DE 19745583.2

(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(72) Inventor(es): DR. LASZLO VERTESY, DR. HERBERT KOGLER, MATTHIAS SCHIELL, DR. JOACHIM WINK

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSTOS LANTIBIÓTICOS RELACIONADOS A ACTAGARDINA, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS MESMOS E PRODUTO FARMACÊUTICO CONTENDO-OS".**

A presente invenção refere-se a novos lantibióticos relacionados a actagardina, particularmente um lantibiótico contendo a designação Ala^0-actagardina, um processo para sua preparação, derivados químicos derivados do lantibiótico e o uso dos lantibióticos como produtos farmacêuticos.

Um número relativamente grande de lantibióticos já tem sido descrito. Lantibióticos são peptídeos policíclicos antibióticos que contêm como aspectos característicos o aminoácido lantionina ou metil-lantionina. Eles são substâncias naturais obtidas microbianamente, que são usados como compostos ativos antibactericidas na terapia humana, como conservantes ou como inibidores de enzima (G. Jung. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991, 30, 1051-1068).

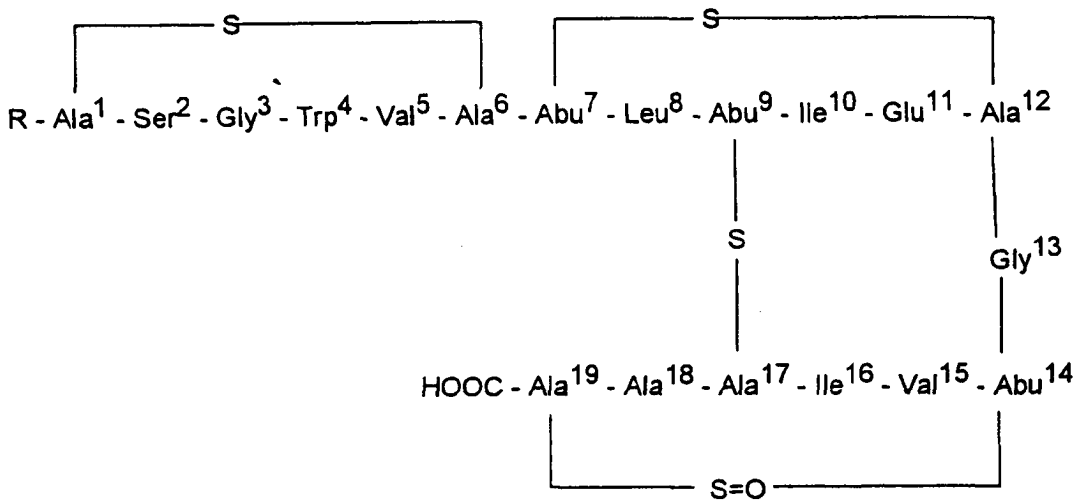
Um grande número de antibióticos é empregado terapeuticamente para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas. As patogênicas, entretanto, estão se tornando crescentemente resistentes aos produtos farmacêuticos usados, um grande perigo até mesmo ameaça devido aos chamados microorganismos multirresistentes, que se tornaram resistentes não somente aos grupos antibióticos individuais, tais como, por exemplo antibióticos de β-lactama ou glicopeptídeos ou macrolídeos, mas ao mesmo tempo carregam sérias resistências. Existem até mesmo patogênicos que se tornaram resistentes a todos os antibióticos comercialmente disponíveis. Doenças infecciosas que são causadas por esses microorganismos não podem mais ser tratadas. Há portanto uma grande necessidade de novos agentes que possam ser empregados contra microorganismos resistentes. Apesar de muitos milhares de antibióticos terem sido descritos na literatura, a maioria entretanto é muito tóxica para ser capaz de ser empregada como produtos farmacêuticos.

Actagardina é um lantibiótico que S. Somma e outros descreveram pela primeira vez em antimicrob. Agentes Chemother, 11, 396-401 em 1977. Sua estrutura somente recentemente foi elucidada (N. Zimmermann e

outros, Eur. J. Biochem, 1995, 228, 786-797).

Verificou-se surpreendentemente que as cepas Actinoplanes liguriae e Actinoplanes garbadiensis em cada caso são capazes de formar pelo menos um novo antibiótico, por exemplo Ala^0-actagardina, que não somente é antibacterianamente muito ativa, mas também altamente tolerável. Um isolado de Actinoplanes liguriae foi depositado na Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares GmbH], Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Alemanha (aqui posteriormente "DMS" , de acordo com as regras da Convenção de Budapeste em 24.09.97 sob o seguinte número: DMS 11797. Um isolado de Actinoplanes garbadiensis foi depositado na DMS de acordo com as regras da Convenção de Budapeste em 24 09 97 sob o seguinte número: DMS 11796.

Correspondentemente, a invenção apresenta compostos da fórmula I



na qual R é o radical de um aminoácido, e seus sais fisiologicamente toleráveis. R pode ser o radical de um aminoácido substituído ou não-substituído no qual o grupo amino está na posição α até ω e na configuração D ou L. Os amino-ácidos substituídos ou não-substituídos na configuração D ou L são particularmente preferidos.

De preferência, R é o radical de um aminoácido natural selecionado do grupo consistindo de: Ala, Gly, Glu, Phe, Pro, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln, Asp, His, Ile, Leu, Lys, Arg, Ser e Val. O aminoácido é particularmente de preferência Ala, Ile, Lys, Phe, Val, Glu, Asp, His, Leu, Arg ou Ser e muito particularmente de preferência o aminoácido é Ala^0.

R pode ser também um radical de ácido diaminoalcanóico substituído ou não-substituído, tal como ácido 2, 4 - diamino butírico (DAb).

A invenção adicionalmente refere-se a um composto de fórmula empírica: $C_{84}H_{129}N_{21}O_{25}S_4$ (Ala^0-actagardina) obtenível por fermentação de Actinoplanes liguriae, DSM 11797 ou Actinoplanes garbadiensis, DSM 11796 ou de uma de suas variantes e/ou mutantes, em um meio de cultura até que o composto Ala^0-actagardina se acumule no caldo de cultura, e por um subseqüente isolamento do composto, e seus sais farmaceuticamente toleráveis.

A invenção, além disso, refere-se a derivados químicos derivados de um composto da fórmula empírica C_{84} $H_{129}N_{21}O_{25}S_4$ (Ala^0 - actagardina), obtenível por fermentação de Actinoplanes liguriae, DSM 11797 ou Actinoplanes garbadientes, DSM 11796 ou uma de suas variantes e/ou mutantes em um meio de cultura até que o composto Ala^0 - actagardina acumule-se em um caldo de cultura, e por subseqüentemente isolamento do composto e conversão em derivados químicos, e seus sais farmacologicamente toleráveis.

Derivados químicos preferidos são Ile^0-actagardina, Lys^0-actagardina, Phe^0-actagardina, Val^0-actagardina, Glu^0-actagardina, Asp^0-actagardina, His^0- actagardina, Leu^0-actagardina, Arg^0-actagardina e Ser^0-actagardina. A conversão de Ala^0-actagardina em derivados químicos mencionados pode ser realizada por processos conhecidos por versados na técnica.

O antibiótico Ala^0-actagardina difere de substâncias conhecidas na literatura por meio das fórmulas estruturais indicadas. Além de actagardina, alguns componentes secundários de actagardina foram adicionalmente descritos (Patente US 4 022 884 de 10 de maio de 1976 e A. Mala-

barba e outros, J. Antibiotics, 1985, 38, 1506-1511), que entretanto diferem, todos, tanto pela polaridade como também, no que diz respeito a actagardina, ou por meio da composição aminoácido, ou por meio da atividade antimicrobiana, ou por meio de outras propriedades físicas, dos compostos de acordo com a invenção.

A cepa Actinoplanes liguriae, DMS 11797 forma actagardina e os subprodutos conhecidos da literatura de soluções nutrientes contendo glicose, amido ou glicerol. Verificou-se surpreendentemente que os mesmos organismos produzem o antibiótico NH_2-R-actagardine de acordo com a invenção em meios pobremente digestíveis contendo manitol com rendimentos muito altos, nos quais R é o radical de um aminoácido natural, particularmente alanina, mas não produz os compostos conhecidos descritos, actagardina propriamente sendo produzida somente em traços.

A invenção além disso refere-se a um processo para a preparação do composto de fórmula I, que compreende a cultura do microorganismo Actinoplanes liguriae, DSM 11797 ou Actinoplanes garbadiensis, DSM 11796 ou uma de suas variantes ou mutantes em um meio nutriente aquoso, o isolamento e purificação de um composto da fórmula I e, se apropriado, uma conversão em seus sais farmacologicamente toleráveis.

O referido processo compreende a cultura de Actinoplanes liguriae, DSM 11797 ou Actinoplanes garbadiensis, DMS 11796, ou seus mutantes e/ou variantes sob condições aeróbicas em meio de cultura contendo uma fonte de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos e elementos de traço.

A cultura é de preferência realizada a uma temperatura entre 20 e 35°C e a um pH entre 4 e 10.

A invenção adicionalmente refere-se a um processo para a preparação de um composto de fórmula I, que compreende a reação do composto actagardina com um aminoácido.

Por exemplo, um éster de aminoácido ativado pode ser reagido com o grupo amino terminal da actagardina. Um grupo protetor, tal como, por exemplo terc-butilóxicarbonila (Boc-), está de preferência ligado ao nitrogênio amino do aminoácido para evitar reações dos ésteres de aminoáci-

dos ativados com eles próprios. Ésteres ativados são, por exemplo, o éster de N-hidroxissuccinimida dos respectivos aminoácidos. O grupo protetor é removido e a mistura de reação é então purificada.

Actinoplanos têm micélio com substrato laranja e nenhum micélio aéreo. Ele forma a esporangia característica dos Actinoplanos.

A parede celular contém ácido mesodiaminopimélico e glicina como aminoácidos característicos, e xilose e arabinose como açúcares; essas são particularidades características dos genes actinoplanos.

Ao invés da cepa DSM 11797 ou 11796, seus mutantes e variantes podem também ser empregados se eles sintetizarem os compostos de acordo com a invenção. Tais mutantes podem ser produzidos por uma maneira conhecida por meio de, por exemplo irradiação, tal como com ultravioleta ou raios X, ou mutagenes químicos, tais como por exemplo, metanossulfonato de etila (SEM); 2-hidróxi-4-metoxibenzofenona (MOB) ou N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG).

Selecionando mutantes e variantes que produzem o antibiótico de acordo com a invenção pode ser executado por determinação da atividade biológica do composto ativo acumulado no caldo de cultura, por exemplo, por teste da ação antibacteriana.

Fontes preferidas de carbono apropriadas para fermentação aeróbica são assimiláveis, mas digerem fracamente carboidratos e álcoois de açúcar, tais como, manitol, inositol e produtos naturais contendo carboidrato, tais como, por exemplo farinha de soja. Nutrientes contendo nitrogênio apropriados são: aminoácidos, peptídeos e proteínas e seus produtos de degradação, tais como peptonas ou triptonas além de extratos de carne, sementes de solo, por exemplo, de milho, trigo, feijões, aveias, sojas ou algodão, resíduos de destilação da produção de álcool, refeições à base de carnes ou extratos de levedo, mas também sais de amônio e nitratos. Sais inorgânicos que a solução nutriente pode conter são, por exemplo, cloretos, carbonatos, sulfatos ou fosfatos dos metais alcalinos ou metais alcalino-terrosos, ferro, zinco, cobalto e manganês.

A formação da Ala(0)-actagardina tem particularmente bom se-

guimento, por exemplo, em uma solução nutriente que contém aproximadamente 0,5 até 5% de manitol, de preferência 1 até 3%, 0,5 até 5% de farinha de soja, de preferência 1 até 3% e uma solução de elemento de traço em uma concentração de 0,1 até 0,5%, de preferência 0,2 até 0,3%. A solução de elemento de traço contém $CaCl_2$, citrato de Fe(III), $MnSO_4$, $ZnCl_2$, $CuSO_4$, tetraborato de sódio, $CoCl_2$ e molibdato de sódio.

A cultura é executada aerobicamente, isto é, por exemplo, submersa com agitação ou misturação em frascos agitadores ou fermentadores, se apropriado com a introdução de ar ou oxigênio. A fermentação pode ser realizada, por exemplo, em garrafas de gargalo largo ou frascos de fundo redondo de vários volumes, em fermentadores de vidro ou tanques de aço V_2A. Ela pode ser realizada em uma faixa de temperatura de cerca de 20 até 35°C, de preferência de aproximadamente 25 até 30°C. O pH deveria estar entre 4 e 10, vantajosamente entre 5,5 e 8,5. O microorganismo é em geral cultivado sob essas condições por um período de 20 até 300 horas, de preferência 24 até 140 horas. A cultura é vantajosamente realizada em vários estágios, isto é, uma ou mais pré-culturas, são primeiro preparadas em um meio nutriente líquido, que é então transferido ao meio de produção efetivo, a cultura principal, por exemplo na proporção de volume 1:10. A pré-cultura é obtida, por exemplo, transferindo um micélio em uma solução nutriente e permitindo que ela se desenvolva por aproximadamente 20 até 120 horas, de preferência 24 até 72 horas. O micélio pode ser obtido, por exemplo, permindo a cepa crescer por aproximadamente 1 até 40 dias, de preferência 3 até 10 dias, em um meio sólido ou líquido, por exemplo, agar levedo-malte ou agar aveia.

O decorrer da fermentação e da formação do antibiótico de acordo com a invenção pode ser monitorado de acordo com processos conhecidos pelos versados na técnica, tais como, por exemplo, teste da atividade biológica em bio-ensaios ou por processos cromatográficos tais como cromatografia de camada fina (TLC) ou cromatografia líquida com alto desempenho (HPLC).

O antibiótico Ala(0) actagardina pode ocorrer ambos no micélio

e no produto filtrado de cultura, comumente a quantidade principal está no produto de cultura filtrado. É portanto conveniente separar a solução de fermentação por filtração ou centrifugação. O produto filtrado é extraído usando-se uma resina de adsorção como uma fase sólida. O micélio é convenientemente extraído com metanol ou acetona; entretanto, outros solventes podem também ser empregados.

As extrações podem ser realizadas em uma ampla faixa de pH, entretanto é conveniente trabalhar-se com meio neutro ou fracamente ácido, de preferência entre pH 3 e pH 7. Os extratos podem ser concentrados e secos, por exemplo em vácuo.

Um processo de isolamento do antibiótico de acordo com a invenção é a partição de soluções de uma maneira propriamente conhecida.

Outro modo de purificação é cromatografia em resinas de adsorção tais como, por exemplo, em Diaion® HP-20 (Mitsubishi Casei Corp., Tóquio), em Amberlite® XAD 7 (Rohm e Haas, USA), em Amberchrom® CG, (Toso Haas, Filadelfia, USA) ou em resinas similares. Numerosos suportes de fase-reversa são, além disso, suportes mais apropriados, por exemplo RP_8 e RP_{18} tal como eles têm sido geralmente publicados, por exemplo, no contexto de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Uma outra possibilidade de purificação do antibiótico de acordo com a invenção consiste no uso dos assim denominados suportes de cromatografia de fase normal, tais como, por exemplo, sílica gel ou Al_2O_3 ou outros de uma maneira propriamente conhecida.

Um processo de isolamento alternativo é o uso de peneiras moleculares, tais como, por exemplo, Fractogel® TSK HW-40, Sephadex® G-25 e outros, de uma maneira propriamente conhecida. Além disso é possível obter-se a ala(0)-actagardina de material enriquecido por cristalização. Por exemplo, solventes orgânicos e suas misturas, anidros ou com adição de água são apropriados para este propósito. Um processo adicional para o isolamento e purificação do antibiótico de acordo com a invenção consiste no uso de trocadores de ânion, de preferência na faixa de pH 4 até 10, e de trocadores de cátion, de preferência na faixa de pH de 2 até 5. O uso de

soluções tampão às quais solventes orgânicos têm sido adicionados é particularmente apropriado para este propósito.

Ala(0)-actagardina, os seus derivados químicos mencionados e os seus equivalentes químicos óbvios podem ser convertidos por processos conhecidos pelo versado na técnica em sais correspondentes farmacologicamente toleráveis.

Equivalentes químicos óbvios dos compostos de acordo com a invenção são compostos que têm uma leve diferença química, isto é têm a mesma atividade ou são convertidos nos compostos de acordo com a invenção sob condições suaves. Os equivalentes mencionados aqui incluem, por exemplo, ésteres, derivados amino, complexos ou adutos dos compostos de acordo com a invenção ou com os compostos de acordo com a invenção.

Sais farmacologicamente toleráveis dos compostos de acordo com a invenção são compreendidos como significando tanto sais inorgânicos quanto orgânicos, tais como eles são descritos na Remington's Pharmaceutical Science (17ª edição, página 1418 (1985)). Possíveis sais são em particular sais de metal alcalino, sais de metal e o acompanhamento terroso, sais com aminas fisiologicamente toleráveis, sais com ácidos inorgânicos ou ácidos orgânicos, tais como, por exemplo, HCl, HBr, H_2SO_4, ácido maléico, ácido fumárico.

As propriedades fisico-químicas e espectroscópicas dos antibióticos de acordo com a invenção podem ser resumidas conforme segue:

Ala(0)-actagardina:

Aparência:

Substância incolor solúvel em metanol e água. Estável em meio neutro e meio medianamente alcalino, mas instável em solução fortemente ácido e fortemente alcalina.

Fórmula empírica:	$C_{84}H_{129}N_{21}S_{20}$
Peso molecular:	1961,21
^1H e ^{13}C-RMN:	ver Tabela 1 e 1
UV máximo (log ε):	280 nm (3,71), 288 nm (ombros).

Tabela 1: Dados Espectroscópicos ^{1}C-RMN de Ala^{0}-actagardina

Amino Ácido	HN	Hα	Hβ	Hy	Outros
Ala^{0}	8,010	2,891	1,383		
Ala^{1}	8,564	4,727	3,397	-	
			2,603		
Ser^{2}	8,264	4,350	3,651		OH: 5,102
Gly^{3}	8,595	3,968	-	-	
		3,263			
Trp^{4}	8,147	4,475	3,311		H5: 7,144; H6: 7,554; H7: 6,983; H8: 7,061; H9: 7,333; indol: 10,740
			2,978		
Val^{5}	7,454	4,558	2,048	0,909	
				0,856	
Ala^{6}	8,487	4,704	2,578		
			2,960		
Abu^{7}	8,324	4,557	3,596	1,176	
Leu^{8}	7,636	4,626	1,418	1,482	
			1,482	Y-Me: 0,860	
Abu^{9}	7,604	7,747	3,570	1,207	
Ile^{10}	8,378	3,763	1,605	1,063	
			β-Me: 0,879	1,642	
Glu^{11}	8,262	3,690	2,178	2,319	
Ala^{12}	7,325	4,553	2,559	-	
			2,866		
Gly^{13}	8,140	3,538	-	-	
		4,167			
Abu^{14}	7,860	4,381	3,336	1,059	
Val^{15}	7,778	4,104	2,042	0,875	
				0,873	
Ile^{16}	7,589	3,867	1,875	1,513	
			β-Me: 0,889	1,115	
Ala^{17}	7,577	4,488	2,594		
			2,878		
Ala^{18}	8,181	4,036	1,232		
Ala^{19}	8,342	4,447	2,934		
			3,069		

Tabela 2: Dados espectroscópicos ^{13}C-RMN de Ala^0-actagardina

Amino	CO	Cα	Cβ	Cy	Outros
Ácido					
Ala^0	169,51	48,35	17,35		
Ala^1	169,27	50,80	34,21		
Ser^2	170,48	55,04	61,23		
Gly^3	168,90	43,44			
Trp^4		54,28	27,62		110,41, 123,28, 127,08, 111,28, 120,83, 136,00, 118,10, 118,22
Val^5	171,20	56,73	31,50	17,76 19,02	
Ala^6	170,14	53,47	32,79		
Abu^7		57,83	43,95	19,96	
Leu^8	171,45	51,01	41,65	24,03	22,38 22,62
Abu^9	171,59	55,77	46,38	20,10	
Ile^{10}	170,95	60,00	35,71 β-Me: 14,70	24,75	11,59
Glu^{11}		55,86	24,49	30,98	173,75
Ala^{12}	170,78	55,47	35,26		
Gly^{13}	170,03	44,18			
Abu^{14}	168,33	55,00	55,64	6,94	
Val^{15}	170,63	60,03	30,02	19,15 18,564	
Ile^{16}	170,66	59,64	35,69 β-Me: 15,53	24,55	10,62
Ala^{17}	169,79	53,13	35,70		
Ala^{16}	171,52	48,89	15,34		
Ala^{19}		47,16	51,53		
não-atribuído	169,01 169,83 170,33 171,01				

A análise de aminoácidos produz um outro Ala adicionalmente aos aminoácidos de actagardina [1 Ser, 2 Gly, 1 Trp, 2 Val, 1 Leu, 2 Ile, 1 Glu, 1 Ala, 1 lantionina (Ala-S-Ala) e 3β-metillantionina (Abu-S-Ala)].

Verificou-se, além disso, que o composto de acordo com a invenção tem ações fortemente antibacterianas; a Tabela 3 resume as concentrações inibidoras mínimas (MIC) de Ala(0)-actagardina como exemplo.

Tabela 3: Atividade in vitro de Ala(0)-actagardina contra bactérias gram-positivas e anaeróbicas no teste de diluição em série.

MICROORGANISMO	Ala(0)-actagardina Valores MIC (µg/ml)
Staph. aureus SG 511	6,25
Staph. aureus 285	6,25
Staph. aureus 503	3,13
Staph. aureus FH 1982	12,5
Staph. aureus 701 E	12,5
Staph. aureus 707 E	12,5
Staph. aureus 9 Tüb.	6,25
Staph. aureus 8236	6,25
S. epidermidis ZH2c	6,25
S. epidermidis 6098W	12,5
S. epidermidis 763	6,25
S. epidermidis 5747IIW	6,25
S. epidermidis 291	12,5
S. epidermidis 799	6,25
E. faecium Md8B	6,25
E. faecium VR1	50
E. faecium VR2	50
S. pyogenes VR3	25
S. pyogenes 308A	6,25
S. pyogenes 77A	0,195
Propionib. acnes 6919	1,0
Propionib. acnes 6922	1,0
Clostrid. tetani 9406	8,0
Clostrid. perfringens 194	0,5

É particularmente valioso notar que o composto de acordo com a invenção não somente tem duas vezes mais atividade antibacteriana contra microorganismos gram-positivos do que actagardina, mas simultaneamente nenhuma resistência cruzada contra antibióticos convencionais, tais como, por exemplo, as β-lactamas (penicilinas, cefalosporinas), aminoglicosídeos (estreptomicina), macrolidas (eritromicina), quinolonas (ciprofloxacina), sulfonamidas ou glicopeptídeos (vancomicina) e outros. Além disso deve ser enfatizada a forte ação inibidora sobre anaeróbicos, que podem causar doenças infecciosas resistentes, e até mesmo com perigo de vida.

Ala(0)-actagardina é especialmente apropriada para a terapia de tais desordens.

A tolerabilidade de Ala(0)-actagardina é boa na concentração ativa e acima. Ações citotóxicas ou outras toxicidades não foram observadas.

A presente invenção, concordantemente, também refere-se ao uso dos compostos de acordo com a invenção como produtos farmacêuticos, e ao uso dos compostos que dizem respeito à preparação de produtos farmacêuticos para o tratamento e/ou profilaxia de infecções bacterianas.

Além disso, a presente invenção refere-se a produtos farmacêuticos que contêm o composto de acordo com a invenção.

O referido produto farmacêutico é preparado por misturação de pelo menos um composto da fórmula I com um auxiliar fisiológico e/ou excipiente e por processamento em uma forma de aplicação apropriada.

Os produtos farmacêuticos de acordo com a invenção podem ser aplicados enteralmente (oralmente), parenteralmente (intramuscularmente ou intravenosamente), retalmente ou localmente (topicamente). Eles podem ser aplicados na forma de soluções, pós (comprimidos, cápsulas incluindo microcápsulas), ungüentos (cremes ou gel), ou supositórios. Auxiliares possíveis para formulações deste tipo são os preenchedores líquidos ou sólidos e extensores, farmaceuticamente usuais, solventes, emulsificantes, lubrificantes, corretores de sabor, colorantes, e/ou substâncias tampão. Como uma dose conveniente, são aplicadas 0,1-1000, de preferência 0,2 -

100 mg/kg de peso corporal. Elas são convenientemente aplicadas em unidades de dosagem que contêm pelo menos a quantidade diária eficaz dos compostos de acordo com a invenção, por exemplo 30-3000, de preferência 50-1000 mg.

A presente invenção pretende ser ilustrada em maior detalhe pelos seguintes exemplos de trabalho e pelo conteúdo das reivindicações da patente.

Exemplo 1: Preparação de uma suspensão de micélio da cepa do produtor

100 ml de solução nutriente (10 g de amido, 10 g de glicerol, 10 g de glicose, 2,5 g de Cornsteep 5 g de peptona e 2 g de extrato de levedo em 1 litro de água canalizada, pH antes da esterilização: 6,0) são inoculados em um frasco Erlenmeyer estéril com a cepa e incubado em um agitador rotativo por 72 horas a 28°C e 140 rpm. 120 ml de fluido de cultura são então uniformemente distribuídos em um frasco Erlenmeyer de 500 ml estéril contendo o meio nutriente de infusão de farinha de aveia, 2,0 g/l, ao qual adicionou-se 15 g de agar/l para solidificação e decantou-se. As culturas são incubadas a 28°C por 10 até 14 dias. O micélio de um frasco formado após este tempo é retirado, imediatamente reusado ou armazenado a -22°C em 50% de glicerol ou em sulfóxido de dimetila 10% a -140°C.

Exemplo 2: Preparação de uma cultura ou uma pré-cultura da cepa do produtor em um frasco Erlenmeyer

Um frasco Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml da solução nutriente descrita no exemplo 1 é inoculado com uma cultura desenvolvida em um tubo inclinado ou com um pedaço de agar e incubado a 140 rpm e 28°C no escuro em um agitador. A produção máxima dos compostos de fórmula I é obtida após cerca de 72 horas. Uma cultura submersa há 72 horas (quantidade de inoculação cerca de 5%) da mesma solução nutriente é suficiente para a inoculação de fermentadores de 10 e 100 litros.

Exemplo 3: Preparação de Ala(0)-actagardina

Um fermentador de 10 litros é operado sob as seguintes condições:

Meio nutriente:	2% de farinha de soja
	2% de manitol
Tempo de incubação:	24 ou 48 horas
Temperatura de incubação:	28°C
Velocidade de agitação:	200 rpm
Aeração:	5 litros de ar/min.

A formação de espuma pode ser suprimida por adição repetida de algumas gotas de solução etanólica de poliol. A produção máxima é obtida após 48 horas.

Exemplo 4: Isolamento do antibiótico Ala(0)-actagardina

27 litros da solução de cultura obtida de acordo com o exemplo 3 são centrifugados e o filtrado de cultura claro é aplicado a uma coluna de 3 litros de capacidade empacotado com a resina de adsorção MCI Gel® CHP20P. dimensões da coluna: largura x altura: 11,3 cm x 30 cm. A coluna é diluída com um gradiente de solvente de 5% de isopropanol em água para 50% de isopropanol e o efluxo da coluna é coletado em frações de 2 litros cada. As frações contendo Ala(0)-actagardina que são checadas por análise HPLC, são coletadas e concentradas em vácuo, e secas por congelamento (4g).

Exemplo 5: Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) da Ala(0) actagardina

Coluna:	Nucleosil® 100 - 5 C_{18}AB, 250/4.
Fase Móvel:	32% de acetonitrila em 10 mM de solução tampão de fosfato de potássio pH7.
Taxa de escoamento:	1 ml por minuto

Detecção por absorção de UV a 210 nm.

Para Ala(0)-actagardina, verificou-se o tempo de retenção de 16 min 50 segundos, para a própria actagardina 11 min e 20 segundos.

Exemplo 6: Concentração da Ala(0)-actagardina

3 g do produto obtido de acordo com o exemplo 4 são aplicados à coluna empacotada com Fractogel® TSK HW-40 s (largura x altura = 10 cm x 50 cm) de 3 litros de capacidade. O efluente, 50% de metanol em

água, é bombeado através da coluna a uma taxa de escoamento de 50 ml por minuto e o efluxo da coluna é coletado em frações (65 ml). O antibiótico Ala(0)-actagardina, 140 mg, é principalmente observado em frações 24 até 28.

Exemplo 7: Purificação final da Ala(0)-actagardina

O antibiótico Ala(0)-actagardina (280 ml) enriquecido, obtido de acordo com o exemplo 6, é aplicado a uma coluna de Nucleosil® 12 C_{18}AB-HPLC (largura x altura = 3,2 cm x 25 cm) no procedimento de gradiente usando 5% até 30% de acetonitrila e 0,05% de ácido triflúoracético. As frações investigadas por HPLC analítico (ver exemplo 5) são correspondentemente combinadas, concentradas a vácuo e secas por congelamento. Elas proporcionam 185 mg de Ala(o)-actagardina em 98% de pureza.

Peso molecular da Ala(0) actagardina determinado pela espectrometria ESI + massa: $M + H^+ = 1962.6$.

Exemplo 8: Obtenção de Lys(0)-actagardina

Dissolve-se 94,5 mg (0,05 mmoles) de actagardina em 10 ml de dimetilformamida anidra (DMF) e 22 mg (0,05 moles) de di-boc-lisina O-N-hidroxisuccinimida, e 100 µl de trietilamina (TEA) também são adicionados, e permite-se que a mistura repouse à temperatura ambiente. O curso da reação é analisado analiticamente por meio de HPLC (ver exemplo 5). Após 96 horas, a reação é descontinuada por remoção de DMF e do TEA em alto vácuo, e o produto de reação é purificado por HPLC preparativo no procedimento de gradiente usando 25 até 50% de acetonitrila em ácido trifluoracético (TFA) com 0,05% de força. As dimensões da coluna são altura x largura 25 mm 250 mm; suporte: Select B®. Após secagem por congelamento das frações contendo o produto de reação, obtém-se 33 mg (0,015 mmoles) de di-Boc-Lys(0)-actagardina.

Os grupos protetores Boc são completamente removidos com TFA 60% de força a TFA. Para tanto, 25 mg (0,011 mmoles) do derivado protegido são dissolvidos em 5 ml de TFA com 60% de força à temperatura ambiente. Após 90 minutos, a remoção é completada. A lisila-actagardina livre é purificada usando o mesmo gradiente, conforme descrito acima, em

uma coluna de HPLC preparativa (10 mm x 250 mm, LiChrospher®). A secagem por congelamento do material purificado obtém 14 mg (0,007 mmoles) de Lys(0)-actagardina. O peso molecular do produto final é checado por espectrometria de massa. Ele é $(M + H)^+$: 2019, correspondendo à fórmula empírica $C_{87}H_{136}O_{25}N_{22}S_4$.

Exemplo 9: A preparação de Ile(0)-actagardina

189 mg (0,1 mmoles) de actagardina são reagidos com 33 mg (0,1 mmoles) de éster de Boc-Ile-O-N-hidroxisuccinimida conforme descrito no Exemplo 8. Obtém-se 210 mg de Boc-Ile(0)-actagardina.

A remoção do grupo protetor Boc e a purificação final proporcionam 84 mg (0,042 mmoles) de Ile(0)-actagardina.

O peso molecular determinado por espectrometria de massa é $(M + H)^+$: 2004, correspondendo à fórmula empírica $C_{87}H_{135}N_{21}S_4$.

Exemplo 10: A preparação de N-α-aminobutiril-actagardina [Abu(0)-actagardina]

94,5 mg (0,05 mmoles) de actagardina são reagidos com 16,3 mg (0,05 mmoles) de para-nitrofenila N-Boc-α-aminobutirado conforme descrito no exemplo 8. Após 9 dias, resultam 54 mg de N-Boc-Abu(0)-actagardina e, após a remoção do grupo protetor, 19 mg (0,01 mmoles) de N-α-aminobutiril-actagardina.

Pico molecular $(M+H)^+$: 1976, correspondendo à fórmula empírica $C_{85}H_{131}O_{25}N_{21}S_4$.

Exemplo 11: A preparação de Gln(0)-actagardina

94,5 mg (0,05 mmoles) de actagardina são reagidos com 16,4 mg (0,05 mmoles) de éster de Boc-glutamina paranitrofenila conforme descrito no exemplo 8. Após a remoção do grupo protetor, são obtidos 38 mg (0,019 mmoles) de Gln (0)-actagardina.

Exemplo 12: A preparação de Phe(0)-actagardina

94,5 mg (0,05 mmoles) de actagardina são reagidos com 15,6 mg (0,05 mmoles) de Boc-Phe-O-N-hidroxisuccinimida éster conforme descrito no exemplo 8. Após a remoção do grupo protetor, obtém-se 26 mg (0,013 mmoles) de Phe(0)-actagardina.

Pico molecular $(M + H)^+$: 2038, correspondendo à fórmula empírica $C_{90}H_{133}O_{25}N_{21}S_4$.

Exemplo 13: A preparação de Phe-Ala (0)-actagardina

94,5 mg(0,05 mmoles) de actagardina são reagidos com 21,7 mg (0,05 mmoles) de éster de Boc-Phe-Al-O-N-hidroxisuccinimida por 3 horas conforme descrito no exemplo 8. Após remoção do grupo protetor, obtém-se 37 mg (0,018 mmoles) de Phe-Ala(0)-actagardina.

Pico molecular $(M + H)^+$: 2109, correspondendo à fórmula empírica $C_{93}H_{138}O_{26}N_{22}S_4$.

Exemplo 14: A preparação de D-Ala(0)-actagardina

94,5 mg (0,05 mmoles) de actagardina são reagidos com 14,5 mg (0,05 mmoles) de éster de Boc-D-Ala-O-N-hidroxisuccinimida por 24 horas conforme descrito no exemplo 8. Após a remoção do grupo protetor, obtém-se 47 mg (0,024 mmoles) de D-Ala(0)-actagardina.

Pico molecular $(M + H)^+$: 1961, correspondendo à fórmula empírica $C_{84}H_{129}O_{25}N_{21}S_4$.

As Tabelas 4 até 6 mostram a atividade antibacteriana in-vitro (valores MIC [μg/ml]) da actagardina (Acta) e dos compostos de acordo com a invenção.

Tabela 4

Tempo de incubação: 24 horas	Acta	Ala-Acta	Ile-Acta	Gln-Acta	Phe-Acta	Phe-Ala-Acta	Lys-Acta	Abu-Acta
S. aureus SG511	20	5	1,2	20	0,6	5	1,2	1,2
S. aureus SG511 + 10% serum	40	20	2,5	40	5	10	2,5	10
S. aureus Exp54146	> 40	40	2,5	> 40	5	20	10	20
S. pyogenes A561	> 40	<= 0,04	<= 0,04	5	> 40	> 40	<= 0,04	> 40
E. faeccium M78L	10	5	5	10	> 40	10	5	> 40
E. coli	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

Tabela 5

Tempo de incubação: 24 horas	Acta	Boc-Ala-Acta	Boc-Ile-Acta	Boc-Gln-Acta	Boc-Phe-Acta	Boc-Phe-Ala-Acta	Boc-Lys-Acta	Boc-Abu-Acta
S. aureus SG511	20	10	20	40	1,2	5	2,5	5
S. aureus SG511 + 10% serum	40	40	40	> 40	10	10	10	10
S. aureus Exp54146	> 40	40	> 40	> 40	5	10	10	> 40
S. pyogenes A561	> 40	0,150	> 40	0,3	<= 0,04	> 40	<= 0,04	> 40
E. faeccium M78L	> 40	20	> 40	40	5	> 40	10	> 40
E. coli	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

Tabela 6

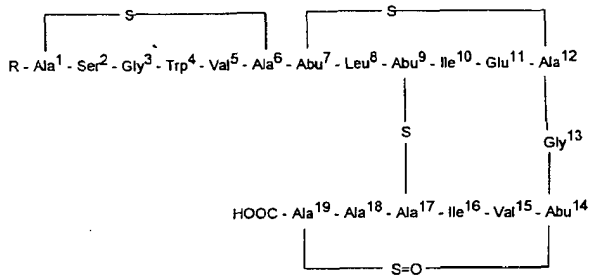
Tempo de incubação: 18 horas	Ala-Acta	Ile-Acta	Boc-Phe-Acta	Lys-Acta	Boc-Lys-Acta
S. aureus 011HT3	20	2,5	5	10	10
Soro S. aureus 011HT3+10%	20	2,5	10	10	20
Soro S. aureus 011HT3+50%	40	5	40	10	40
S. aureus 011HT18	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
S. epidermidis 012GO20	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
S. aureus 011HT1	1,1	1,2	10	0,6	10
S. aureus 011DU5	40	10	40	10	40
S. aureus 011CB20	> 40	40	> 40	> 40	-
S. aureus 0121O64	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
S. epidermidis 012GO42	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
Staph. coag. negativo 012HT5	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
S. pyogenes O2A1SJ1	<= 0,04	<= 0,04	0,08	<= 0,04	0,08
S. pyogenes 02A1UC1	<= 0,04	<= 0,04	<= 0,04	<= 0,04	<= 0,04
S. pyogenes 02A1F16	<= 0,04	<= 0,04	<= 0,04	<= 0,04	<= 0,04

Tabela 6 - continuação

Tempo de incubação: 18 horas	Ala-Acta	Ile-Acta	Boc-Phe-Acta	Lys-Acta	Boc-Lys-Acta
Strepto gr. G 02G0CB2	20	10	2,5	5	2,5
S. pneumoniae 030B12	2,5	1,2	1,2	2,5	1,2
S. milleri 02milGR12	40	> 40	40	40	5
S. mitis 02mitGR16	20	10	20	10	5
E. faecalis 02D2HM9	> 40	40	40	> 40	> 40
E. faecalis 02D2UC5	20	40	40	40	40
E. faecalis 02D2DU18	5	5	10	5	10
E. faecalis 02D2HT10	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos, caracterizados pelo fato de apresentarem a fórmula I



na qual R ou é um radical D-Ala ou é um radical Gln, Ile, Phe, Lys, Abu e Phe-Ala na configuração D ou L, ou seus sais fisiologicamente toleráveis.

2. Compostos da fórmula I de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de R ser D-Ala, Ile e Lys.

3. Compostos da fórmula I de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizados pelo fato de o nitrogênio amino de R carregar um grupo protetor removível.

4. Processo para a preparação de um composto da fórmula I indicada e definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a) fermentar o microorganismo Actinoplanes liguriae, DSM 11797, ou Actinoplanes garbadiensis, DSM 11796, em um meio de cultura;

b) reagir a actagardina com um aminoácido protegido ou Phe-Ala protegido;

c) remover o grupo protetor do composto resultante;

d) isolar o composto; e

e) opcionalmente converter o composto em um seu sal farmacologicamente tolerável.

5. Produto farmacêutico, caracterizado pelo fato de conter pelo menos um composto de fórmula I, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e um ou mais preenchedores líquidos, extensores, solventes, emulsificantes, lubrificantes, corretores de sabor, corantes, e/ou substâncias tampão.

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSTOS LANTIBIÓTICOS RELACIONADOS A ACTAGARDINA, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS MESMOS E PRODUTO FARMACÊUTICO CONTENDO-OS".**

A presente invenção refere-se a novos lantibióticos contendo a fórmula NH_2-R-actagardina, na qual NH_2-R é o radical do aminoácido alanina, que é formado pelo microorganismo Actinoplanes liguriae, DSM 11797 ou Actinoplanes garbadiensis, DSM 11796 durante a fermentação, derivados químicos do lantibiótico, um processo para sua preparação e o uso dos lantibióticos como produtos farmacêuticos.