

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 85 372

**REQUERENTE:** MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH FOUNDATION,  
japonesa, com sede em 14-23, Kamiosaki  
3 chome, Shinagawa-Ku, Tokyo 141, Japão

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE BISUCABERINA  
E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE A CONTEM"

**INVENTORES:** Hamao Umezawa, Yoshiro Okami,  
Shogo Kurasawa, Toshiuki Kameyama,  
Atsushi Takahashi e Masaaki Ishizuka

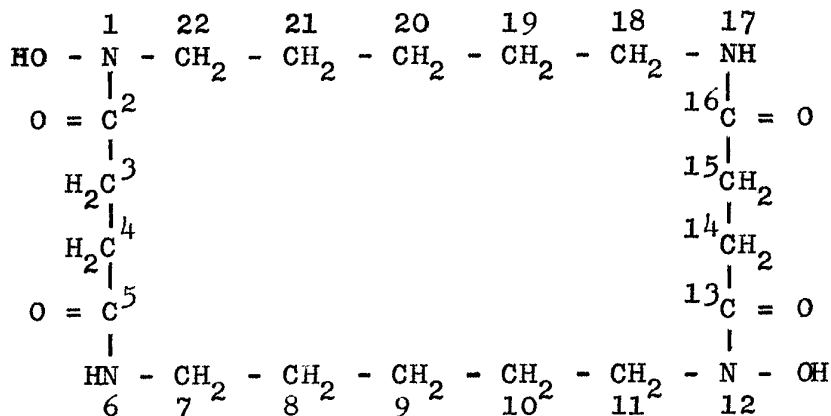
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

Japão, em 22 de Julho de 1986, sob o No. Sho 61-170856

Memória descritiva referente à patente de invenção de MICRO-BIAL CHEMISTRY RESEARCH FOUNDATION, japonesa, industrial e comercial, com sede em 14-23, Kamiosaki 3 chome, Shinagawa-Ku, Tokio 141, Japão (inventores: Hamao Umezawa, Yoshiro Okami, Shogo Kurasawa, Toshiu ki Kameyama, Atsushi Takahashi e Masaaki Ishizuka, residentes no Japão), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE BISUCABERINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A CONTÊM".

MEMÓRIA DESCRITIVA

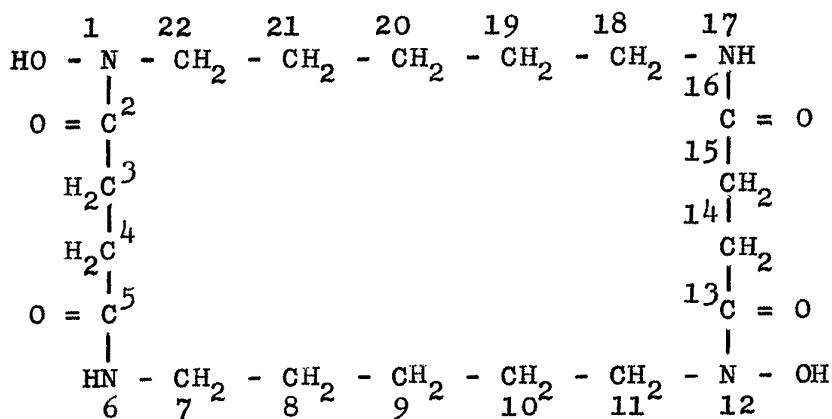
Esta invenção diz respeito a um processo para a preparação de bisucaberina (1,12-dihidroxi-1,6,12,17-tetraazaciclodocosano-2,5,13,16-tetraona) da seguinte fórmula I



São conhecidos numerosos antibióticos produzidos por microorganismos e muitos relatórios têm-se referido a substâncias que possuem actividade antitumoral.

Verificou-se agora que um microorganismo do género Anteromonas produz uma nova substância que possui actividade antitumoral.

Consequentemente, esta invenção fornece um método para a preparação da bisucaberina da seguinte fórmula I



que compreende a cultura de um microorganismo pertencente ao género Alteromonas e que possua a capacidade de produzir bisucaberina, e em seguida a recuperação da bisucaberina do caldo de cultura.

O nome químico da bisucaberina é 1,12-dihidroxi-1,6,12,17-tetraazaciclodocosano-2,5,13,16-tetraona. Esta substância possui as seguintes propriedades físico-químicas:

(a) Aparência: Cristais incolores

(b) Ponto de fusão: 190°C (decomposição)

(c) Espectro de absorção de ultravioleta:

$\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 215 \text{ nm (5740) em metanol, 215 nm (5700) em ácido clorídrico-metanol 0,1 N}$

(d) Peso molecular

$m/z = 401 (\text{MH}^+)$  por SIMS (espectrometria de massa do ião secundário)

$m/z = 401 (\text{MH}^+)$  por EIMS (espectrometria de massa do ião

electrónico

(e) Fórmula molecular:  $C_{18}H_{32}N_4O_6$

(f) Análise elementar:	C%	H%	N%	O%
Verificado:	53,69	7,97	13,20	(25,14)
Calculado :	54,00	8,00	14,00	(24,00)

(g) Espectro de absorção de infravermelho:

representado na Figura 1.

Espectro NMR de prótons: representado na Figura 2.

Espectro  $^{13}C$ -NMR: representado na Figura 3.

(j) Solubilidade:

Solúvel em dimetilsulfóxido, levemente solúvel em metanol e moderadamente solúvel ou insolúvel em água.

(k) Reacções coradas:

Positiva na reacção molibdénio-ácido sulfúrico, na reacção da toluidina e reacção do cloreto férrico e negativa na reacção da ninidrina

(l) Cromatografia em camada fina em sílica gel (art 5715, Merck):  $R_f = 0,52$  para clorofórmio:metanol (90:10)

$R_f = 0,38$  para clorofórmio:metanol (92:8)

(m) Electroforese em papel de alta-voltagem (3000 V, 20 minutos):

$R_m = 0,0$  para ácido fórmico:ácido acético:água (1:3:36) expresso em mobilidade relativa tomando a mobilidade da alanina como 1,0.

Nenhuma das substâncias conhecidas têm as características mencionadas. Consequentemente considerou-se a bisucaberina um composto novo.

A bisucaberina, de acordo com esta invenção, está presente no caldo de cultura do microorganismo produtor de bisucaberina do género Alteromonas e pode ser recuperada a partir dele. Um exemplo de microorganismo produtor de bisucaberina é a estirpe Alteromonas haloplanktis SB-1123. Esta estirpe foi isolada por nós a partir duma amostra de solos que foi colhida no fundo de uma região de mar profundo vizinho da Prefeitura de Aomori, Japão. Tem as seguintes características

microbiológicas:

(a) Características morfológicas

- 1) Forma e dimensões das células: Bastonetes, 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  x 1,5-2,0  $\mu\text{m}$
- 2) Mobilidade: Móvel
- 3) Esporos: nenhuns
- 4) Coloração de Gram: Negativa

(b) Características das culturas em vários meios

- 1) Em meio de cultura para placa de caldo de agar: Não cresceu
- 2) Em meio de cultura para placa de meio Z de agar: Crescimento moderado, circular, plano a convexo, inteiro, macio, luminiscente húmido, translúcido, amarelo claro (meio Z: água do mar a pH 7,2 contendo 0,5% de polipeptona e 0,1% de extracto de levedura)
- 3) Em meio de cultura para cunha de caldo de agar : Não cresceu
- 4) Em meio de cultura para cunha de meio Z de agar: Crescimento moderado, algo disperso, luminiscente húmido, amarelo claro amanteigado
- 5) Em meio de cultura de caldo líquido: Não cresceu
- 6) Em meio de cultura líquido de caldo de água do mar: Crescimento intermédio
- 7) Em meio de cultura para inoculação com agulha de caldo de gelatina: Não se modificou
- 8) Em meio de cultura para inoculação com agulha de caldo de água do mar-gelatina: Liquefacção

(c) Características fisiológicas

- 1) Redução de nitratos: Negativa
- 2) Reacção de denitrificação: Negativa
- 3) Ensaio MR: Negativo
- 4) Ensaio VP: Negativo
- 5) Produção de sulfureto de hidrogénio: Negativa
- 6) Hidrólise do amido: Negativa
- 7) Produção de pigmentos: Não produz pigmentos solúveis em água

- 8) Oxidase: Positiva  
9) Catalase: Positiva  
10) Gamas de crescimento:  
Temperatura Bom crescimento a 10 até 34°C (gama óptima: 14 a 30°C), não há crescimento a 4°C e 39°C.  
pH 6 a 9  
11) Comportamento em relação ao oxigénio: Aeróbico  
12) Ensaio O-F pelo método de Hugh & Leifson: Não há produção de ácidos  
13) Reacção de decarboxilase: Negativa para lisina e negativa para arginina  
14) Necessidades de nutriente: Não há crescimento na ausência de água do mar ou de uma solução de sais inorgânicos com uma composição similar  
15) Utilização de compostos:
- |                 |   |                         |   |   |
|-----------------|---|-------------------------|---|---|
| D-Glucose       | + | ; N-Acetil glucosamina  | + | ; |
| D-Manose        | + | ; Ácido succínico       | + | ; |
| D-Fructose      | + | ; Ácido fumárico        | + | ; |
| Sacarose        | + | ; Ácido cítrico         | + | ; |
| Maltose         | + | ; Ácido acotínico       | - | ; |
| Celobiose       | - | ; Eritritol             | - | ; |
| Melibiose       | - | ; Manitol               | - | ; |
| Lactose         | - | ; Glicerol              | - | ; |
| L-Treonina      | - | ; Ácido γ-aminobutírico | - | ; |
| L-Tirosina      | ± | ; D-Sorbitol            | - | ; |
| Putrescina      | - | ; Ácido maleico         | - | ; |
| Amido           | ± | ; Ácido α-cetoglutárico | - | ; |
| Ácido glucónico | - |                         |   |   |
- 16) Conteúdo de ADN por CG: 44,1%

As características microbiológicas do microorganismo acima mencionadas são resumidas como a seguir:

- (1) O microorganismo é uma bactéria marinha.
- (2) Cresce somente em condições aeróbicas.
- (3) É um bacilo Gram-negativo
- (4) É móvel com flagelos polares.
- (5) Decompõe sacarídeos por oxidação e utiliza sacarídeos.

(6) Tem um conteúdo de ADN-CG de 44,1%.

Pesquisa feita no manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática, Vol. 1 (1984) à luz das características citadas mostrou que o citado microorganismo se relaciona intimamente com o gênero Alteromonas. Por isso o microorganismo foi identificado como uma bactéria do gênero Alteromonas.

Subsequente pesquisa sobre as espécies mostrou que o microorganismo se assemelha a Alteromonas haloplanktis baseada nas seguintes características importantes: não cresce a 4°C; pode utilizar compostos tais como D-manose, sacarose, maltose, N-acetil-glucosamina, ácido succínico, ácido fumárico e ácido cítrico como fontes de carbono; não pode utilizar compostos tais como eritritol, glicerol, sorbitol, ácido maleico e ácido  $\alpha$ -cetoglutárico como fontes de carbono; e não produz pigmentos solúveis. Apesar da sua incapacidade para utilizar ácido acotínico como fonte de carbono não estar de acordo com a descrição na literatura, não é uma diferença significativa no que diz respeito a distinguir o microorganismo da espécie Alteromonas haloplanktis. Consequentemente o microorganismo foi identificado como sendo Alteromonas haloplanktis (ZoBell and Upham 1944) Reichelt and Baumann 1973.

O microorganismo foi depositado como Alteromonas haloplanktis SB-1123 no Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry do Japão, onde foi designado por FERM P-8803. Além deste microorganismo, esta invenção pode usar qualquer das variantes obtidas por sua mutação artificial ou espontânea, na condição de terem a capacidade de produzir bisucaberina.

A cultura do microorganismo que produz bisucaberina é realizada usando um meio de cultura preparado dissolvendo fontes de carbono, fontes de azoto, iões inorgânicos e, se se desejar, vitaminas e aminoácidos em água do mar (inclu-

indo água do mar artificial). As fontes de carbono podem ser as de uso habitual para a cultura de microorganismos. Exemplos preferidos são hidratos de carbono tais como glucose, sucrose, amido e dextrina. As fontes de azoto podem ser as que são de uso habitual para a cultura de microorganismos. Exemplos incluem peptona, extracto de levedura, extracto de carne, licor de maceração de milho, caldo de soja, caseína e iões amónia. Para a produção eficiente de bisucaberina, o método recomendado é usar um meio de cultura de uma forma tratada, como seja numa forma moída, de choco seco e/ou sardinha seca, preferentemente a de Eugraulis japonica, em água do mar artificial.

A cultura pode ser de preferência uma cultura líquida sob agitação e arejamento. A temperatura da cultura é usualmente 10 a 35°C, de preferência 24 a 30°C. A cultura deve prosseguir até que uma quantidade suficiente de bisucaberina se acumule no caldo de cultura. Normalmente, isto é atingido em 16 horas a 5 dias.

A recuperação da bisucaberina do caldo de cultura pode ser feita por um método conhecido. Um exemplo de tal método compreende centrifugar o caldo de cultura para obter um sobrenadante, passá-lo através de uma camada de resina absorvente sintética para dar fracções e em seguida concentrá-las para precipitar cristais, e purificá-los.

A bisucaberina obtida de acordo com o processo da presente invenção tem actividade antitumoral. Por exemplo, estimula a actividade citolítica de macrófagos contra células de cancro e inibe a proliferação de células de cancro.

Esta invenção será descrita com mais pormenor no que diz respeito aos Exemplos mas não fica a eles limitada.

#### Exemplo 1

A estirpe Alteromonas haloplanktis SB-1123



(FERM P-8803) foi inoculada em 10 litros de um meio de cultura (pH 7,2) contendo 2% de choco e 1% de sardinha seca (Eugrallis japonica), ambos sob forma moída, em água do mar artificial (Jamarin S, um produto de Jamarin Laboratory Inc.) diluída a metade da concentração. O inóculo foi cultivado sob agitação durante 3 dias a 27°C.

O meio de cultura recolhido foi centrifugado para obter um sobrenadante. Passaram-se 7 litros do sobrenadante através de uma coluna de Diaion HP-20 (500 ml), que foi lavada com 5 litros de água. Depois eluiu-se a coluna com uma mistura de acetona e água 50:50, e recolheram-se 2 litros de fracções activas. As fracções activas reunidas foram concentradas sob pressão reduzida para precipitar cristais do produto bruto. Lavaram-se os cristais com acetona e depois com acetato de etilo para dar cristais de bisucaberina numa quantidade de 2 g.

Se os cristais ficaram castanhos devido a incorporação de impurezas neles, podem facilmente converter-se em cristais puros de bisucaberina, incolores, em lâminas da seguinte maneira: São submetidos a uma cromatografia em coluna de sílica gel usando clorofórmio-metanol (96:4) como sistema de eluição. As fracções activas são reunidas e concentradas para obter bisucaberina pura.

#### Exemplo 2

Investigou-se o efeito da bisucaberina na actividade citolítica de macrófagos contra células de cancro.

Obtiveram-se macrófagos a partir de células de exsudado peritoneal induzido pela injeção intraperitoneal de proteose-peptona (Difco) a 10% em fêmeas de rato C3H/HeN de 8 semanas de idade, seguida de remoção das células não aderentes a plásticos. As células de cancro escolhidas foram células de fibrosarcoma L-1023 induzidas nos ratos C3H/HeN com

metil-colantreno, sendo as ditas células marcadas previamente com timidina tritiada. A cultura das células foi levada a efeito num meio de cultura RPMI 1640 a 37°C na presença de 5% de carbono.


Uma microplaca de 96 alvéolos foi preparada com  $2 \times 10^5$  células/alvéolo de macrófagos e  $1 \times 10^4$  células/alvéolo das células de cancro escolhidas e incubada durante 2 dias na presença de uma quantidade predeterminada de bisucaberina. Depois mediu-se a quantidade de trítio cedida pelas células de cancro lisadas no sobrenadante do caldo cultivado. Os resultados são apresentados no Quadro 1. A actividade citolítica foi representada pela % de citólise calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Citólise (\%)} = \frac{[(\text{quantidade libertada na experiência}) - (\text{quantidade libertada espontaneamente})] / (\text{quantidade de libertação máxima}) - (\text{quantidade libertada espontaneamente})}{7}$$

em que (quantidade libertada espontaneamente) representa o valor quando não se adicionou qualquer amostra à cultura e (quantidade de libertação máxima) representa o valor quando 0,5% de SDS foi adicionado em vez dos macrófagos.

Quadro 1

Quantidade de bisucaberina adicionada (µg/ml, concentração final)	Citólise (%)		
	+ Macrófagos (%)	- Macrófagos (%)	
67	38,6	41,5	15,3
33	64,8	71,8	12,0
11	45,7	47,1	6,5
3,6	13,3	14,8	0,3
1,2	2,8	-	-
0	0	-	0



### Exemplo 3

A actividade da bisucaberina para inibir o crescimento de células de leucémia L-1210 e de células de carcinoma IMC de rato foi investigada. As condições experimentais foram as seguintes:

#### (1) Células de tumor

- a) L-1210: Cultivadas em passagem num meio de cultura NEM contendo soro de vitela a 10%.
- b) carcinoma: Cultivado em passagem num meio de cultura RPMI 1640 contendo soro fetal de bovino.

As células de tumor na fase exponencial foram usadas nas experiências, tendo cada cultura sido iniciada um dia antes das experiências.

#### (2) Amostra

A bisucaberina foi dissolvida em dimetil-sul-fóxido num volume que era 10% da solução final. À solução adicionaram-se 5 µl de Tween 80, e a mistura foi ajustada a uma concentração de 2 mg/ml com um meio de cultura MEM. Esta solução de reserva foi diluída seriadamente em seis degraus com o mesmo meio de cultura, de cada vez com uma razão de diluição de 4.

#### (3) Método

- a) Uma microplaca de 96 alvéolos foi preparada com 10 µl/alvéolo da solução amostra, tendo cada solução amostra preenchido 3 alvéolos para cada uma das espécies ensaiadas.
- b) As células de tumor foram suspensas no respectivo meio por cultura de passagem a uma velocidade de  $1 \times 10^5$  células por ml, e as suspensões foram adicionadas à microplaca numa quantidade de 0,2 ml/alvéolo.
- c) Depois de 48 horas de cultura a 37°C num incubador de dióxido de carbono, tomaram-se 0,1 ml da suspensão de

células e diluíram-se 100 vezes com ISOTON II com uma solução salina fisiológica. O número de células na diluição resultante foi contado usando um Coulter Counter.

- d) A inibição percentual do crescimento de células foi calculado para cada diluição da solução amostra em comparação com o guia. Os resultados foram postos num gráfico para preparar uma curva de concentração de bisucaberina relacionada com a % de inibição. A partir desta curva,  $IC_{50}$ , a concentração de bisucaberina correspondente a 50% de inibição foi determinada. Os valores de % de inibição e de  $IC_{50}$  são apresentados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2

Células de tumor	Concentração de amostra ( $\mu\text{g/ml}$ )	Contagem de células	% de inibidor
L-1210		2888 $\pm$ 106	-
	Bisucaberina 100,0	429 $\pm$ 47	85
	25,0	425 $\pm$ 3	85
	6,25	908 $\pm$ 11	69
	1,56	2428 $\pm$ 100	16
	0,39	2727 $\pm$ 151	6
IMC carci- noma		3910 $\pm$ 96	-
	Bisucaberina 100,0	557 $\pm$ 26	86
	25,0	547 $\pm$ 16	86
	6,25	1712 $\pm$ 24	56
	1,56	3374 $\pm$ 44	14
	0,39	3602 $\pm$ 2	8

Quadro 3

<u>Células de tumor</u>	<u><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</u>
L-1210	3,9
Carcinoma IMC	5,1

Breve descrição dos Desenhos (Figs. 1, 2 e 3)

A Fig. 1 é o espectro de absorção de infravermelho da bisucaberina.

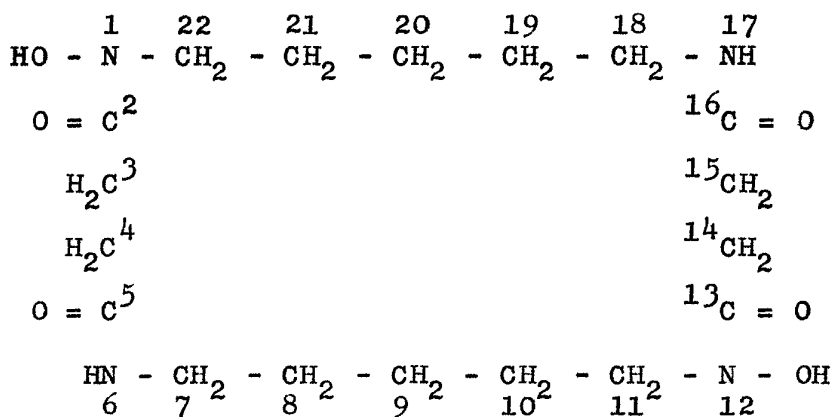
A Fig. 2 é o espectro de NMR de próton de bisucaberina medido em solução de  $d_6$ -DMSO com TMS como material de referência.

A Fig. 3 é o espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR de bisucaberina medido em solução de  $d_6$ -DMSO com DMSO como material de referência.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação do novo composto bisucaberina da fórmula I



caracterizado por se cultivar um microorganismo do gênero A1-

teromonas produtor de bisucaberina e se recuperar a bisucaberina do caldo de cultura.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o microorganismo do género Alteromonas produtor de bisucaberina ser a estirpe Alteromonas haloplanktis SB-1123 (FERM P-8803).

- 3ª -

Processo para a preparação duma composição farmacêutica útil como medicamento dotado de actividade anti-tumoral caracterizado por se incorporar como ingrediente activo o composto da fórmula I quando preparado pelo processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 em associação com uma substância veicular farmaceuticamente aceitável.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado no Japão em 22 de Julho de 1986, sob o nº Sho 61-170856.

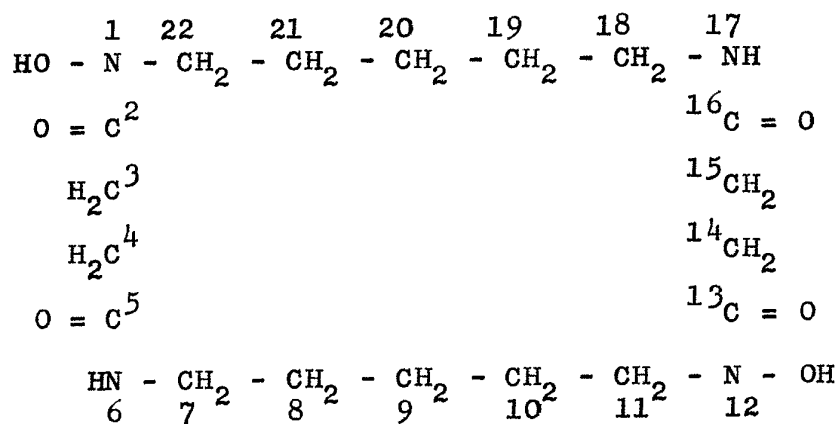
Lisboa, 21 de Julho de 1987

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 BISUCABERINA  
E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação do novo composto bisucaberina da fórmula I



que compreende cultivar-se um microorganismo do gênero Alteromonas produtor de bisucaberina e se recuperar a bisucaberina do calco de cultura.

FIG.1

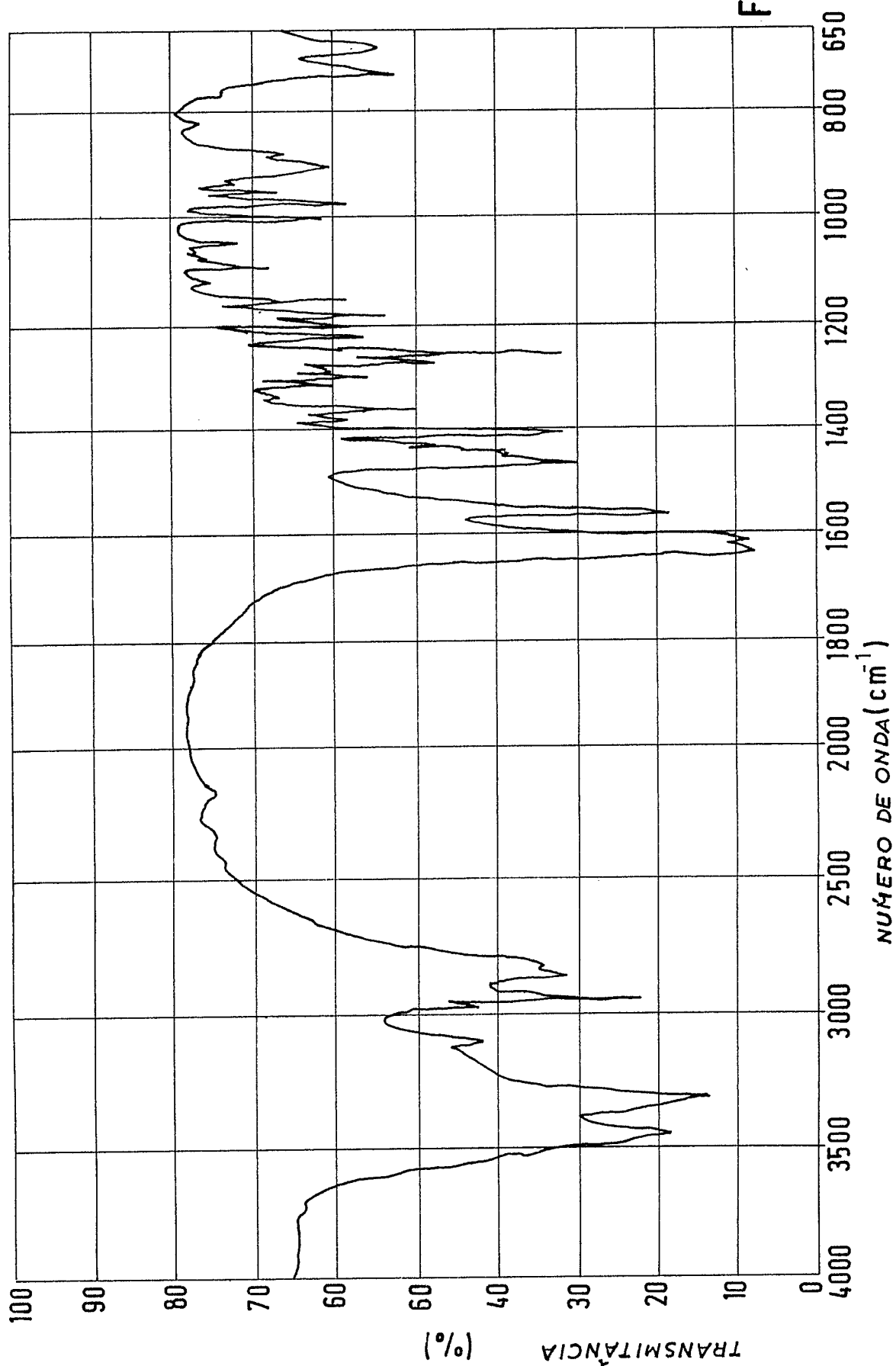
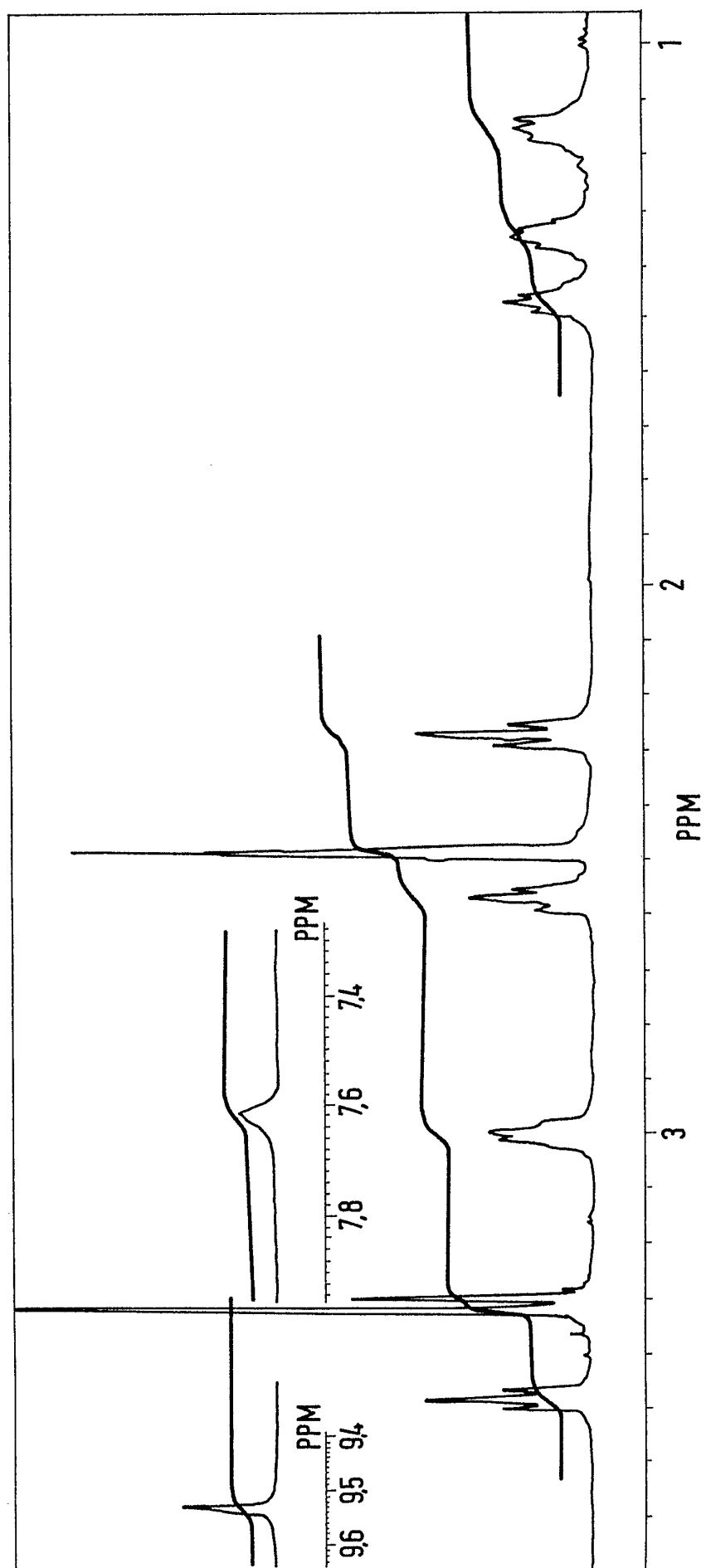




FIG. 2

2 / 3



1

FIG. 3

