

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96.451

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-6230 Frankfurt am Main, República Federal Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ALISAMICINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE O CONTÊM"

INVENTORES: Dr. Christopher Milton Mathew Franco, Dr. Erra Koteswara Satya Vijayakumar, Dr. Sugata Chatterjee, Dr. Bimal Naresh Ganguli, Dr. Jürgen Blumbach, residentes na Índia e Dr. Herbert Kogler e Dr. Hans-Wolfram Fehlhaber, residentes na R.F.A.

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

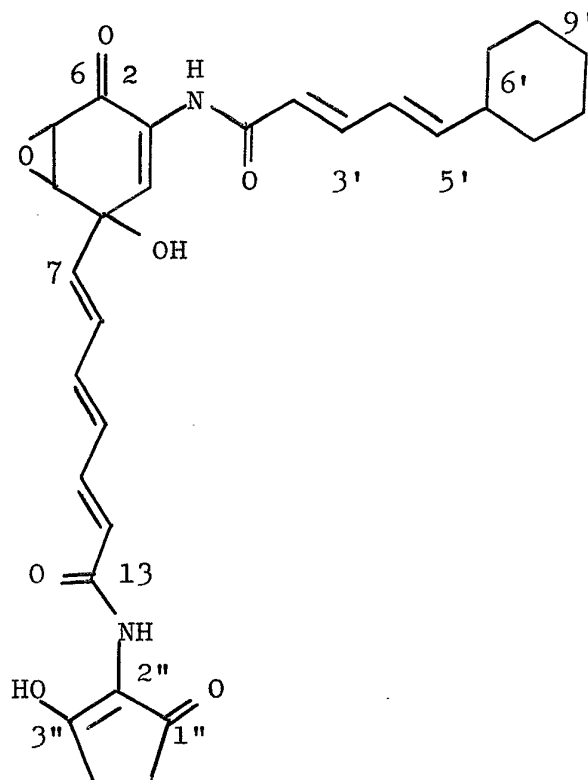
República Federal Alemã em 12 de Janeiro de 1990, sob o No. 90100591.8.

Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main, República Federal Alemã (inventores: Dr. Christopher Milton Mathew Franco, Dr. Erra Koteswara Satya Vijayakumar, Dr. Sugata Chatterjee, Dr. Bimal Naresh Ganguli, Dr. Jürgen Blumbach, residentes na Índia e Dr. Herbert Kogler e Dr. Hans-Wolfram Fehlhaber, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ALISAMICINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE O CONTÊM".

Descrição

A presente invenção refere-se a novos antibióticos designados por "Alisamicina", a um processo para a sua preparação com uma nova estirpe de microrganismos pertencentes a espécie "streptomices", de uma cultura com o número HIL Y-88, 31582, seus mutantes e variantes, e a sua utilização como fármaco terapêutico.

A Alasamicina é um composto de fórmula I



(I)

Isolou-se a estirpe Str. sp. Y-88,31582 a partir de solo recolhido em Alibag, Maharashtra, India. Essa estirpe foi depositada de acordo com as condições do tratado de Budapeste com o "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig" em 4 de Outubro de 1989 (DSM No. 5559). É possível contar variantes e mutantes da cultura número HIL Y-88,31582 recorrendo a um processo conhecido em que se utiliza o mutageno, tal como a N-metil-N-nitro-N-nitroso-guanidina ou a radiação ultra violeta. O micro organismo Str. sp. Y-88,31582 pertence à ordem dos Actinomycetales, família dos Streptomycetaceae, e género Streptomices.

Admite-se que a estirpe Str. sp. Y-88,31582 seja uma estirpe nova uma vez que difere das estirpes conhecidas em algumas das suas características morfológicas, culturais e fisiológicas.

Admite-se ainda que seja uma estirpe nova devido ao facto de produzir um novo composto antibiótico designado por Alisamicina ao qual se referira a memória descritiva que

se segue.

Conforme é evidente em conformidade com a memória descritiva pormenorizada da presente invenção, a Alisamicina da presente invenção pertence a classe de antibióticos Manumicina, mas difere de todos os membros conhecidos desta classe tais como Manumicina (J. Antibiotics 40, 1530-1554, 1987), Asucamicina (J. Amer. Chem. Soc. 101, 3402-3404, 1979), Colabomicina (J. Antibiotics 41, 1178-1195, 1988), U-54407 (J. Antibiotics 36, 950-956, 1983) e U-62162 (J. Antibiotics 35, 556-560, 1982).

Os novos antibióticos da presente invenção, são activos in vitro contra diversas bactérias gram-positivas, leveduras e fungos. Em consequência, podem ser utilizados como fármacos terapêuticos em medicina humana e veterinária e também nas técnicas de nutrição de animais.

De acordo com a presente invenção proporciona-se ainda um processo para isolar a estirpe Str. sp. Y-88,31582 a partir de solo utilizando um meio nutriente com um pH compreendido entre 6,5 e 8,5, utilizando um método conhecido.

Um meio nutriente utilizado para isolar o micro organismo a partir do solo e constituído por fontes de carbono e de azoto, sais nutrientes inorgânicos e agentes solidificantes. As fontes de carbono podem ser, por exemplo, a glicose o amido, a dextrina, o glicerol, a sacarose ou os melagos. As fontes de azoto podem ser, por exemplo, a peptona, o extracto de levedura, o extracto de carne, a caseína do extracto de malte ou os amino-ácidos tais como argila ou a asparagina. O agente solidificante pode ser, por exemplo, o ágar. Os sais nutrientes inorgânicos podem ser, por exemplo, os sais de sódio, de potássio, de magnésio, de cálcio, de ferro, de zinco, de manganês, de cobre, de fósforo ou de enxofre.

Os microrganismos da presente invenção caracterizam-se por micelios aereos incolores alongados a partir de micélius de substrato ramificado. Os esporos são formados em

cadeias lineares na parte superior dos micélius aéreos representativos da secção "Rectiflexiblis". Não foram observados esporos enrolados ou ascospores. As cadeias de esporos maduros contêm mais de 30 esporos cada uma. Tomando como base as características culturais e morfológicas do microrganismo em diversos meios de ágar e também uma análise das paredes celulares que demonstrou a presença de ácido LL-diaminopimelico, identificou-se o organismo produtor como sendo Streptomices sp.

É evidente para os especialistas na matéria que a presente invenção não fica limitada ao organismo particular anteriormente especificado, englobando também os mutantes e variantes espontaneos e artificiais derivados desse microrganismo, os quais sejam capazes de produzir um novo antibiótico Alisamicina.

De acordo com a presente invenção proporciona-se também um processo para a produção de Alisamicina, consistindo esse processo em cultivar a estirpe Str. sp. Y-88,31582 por fermentação para valores de pH compreendidos entre 6,0 e 9,0, de preferência compreendidos entre 6 e 7, e uma temperatura compreendida entre 18°-40°C, de preferência compreendida entre 20° e 37°C, sob condições aeróbicas num meio nutriente que contenha fontes de carbono e de azoto, sais inorgânicos nutrientes e elementos raros, isolando-se depois o composto a partir do caldo de cultura por um processo conhecido tal como agora descrito.

As fontes de carbono utilizadas num meio nutriente para a produção de novos antibióticos, podem ser, por exemplo, a glicose, o amido, a dextrina, o glicerol, a sacarose, os melaços ou óleos. As fontes de azoto utilizadas no meio nutriente para a produção dos novos antibióticos, podem ser, por exemplo, a farinha de soja, o extrato de levedura, o extrato de carne, o extrato de malte, licor de infusão de cereais, peptona, gelatina ou caseína. Os sais inorgânicos nutrientes utilizados no meio nutriente para a produção dos novos antibióticos podem ser, por exemplo, o cloreto de sódio, o sulfato de magnésio, o sulfato de amônio ou o carbonato de

cálcio. Como elementos raros pode utilizar-se por exemplo, ferro, manganês, cobre, zinco ou cobalto.

De preferência cultiva-se estirpes *Str. sp.* Y-88,31582 a uma temperatura próxima de 27°C e para um pH com um valor próximo de 7,0. Preferencialmente interrompe-se a fermentação decorridas 23-48 h. o que corresponde aos rendimentos máximos compostos obtidos. De preferência a fermentação pode ser do tipo submerso. O processo de fermentação e a formação dos novos compostos antibióticos podem ser controlados pela actividade anti-bacteriana do fundo da cultura e dos correspondentes micélios por contraste com a estirpe *Staphylococcus aureus* 209 P em meio de ágar e por cromatografia de camada fina sobre placas de gel de sílica e utilizando o acetato de etilo como solvente de processamento.

Se desejado, pode utilizar-se o agente anti-espumante tal como "Desmophen"® (um poliéter de cadeia linear com base em óxido de propileno da Bayer Ag., Leverkusen) num meio nutriente durante a fermentação da cultura.

A Alisamicina pode ser obtida a partir do caldo de cultura, por exemplo, por extracção com um solvente imiscível com a água depois de se ter ajustado o pH para um valor compreendido entre 6,5 e 7,5. Os solventes utilizáveis podem ser o acetato de etilo ou o clorofórmio; de preferência utiliza-se o acetato de etilo e é preferível que o pH tenha o valor de 7,0. O extrato do solvente é concentrado para se remover esse solvente e depois submete-se a cromatografia. Também se pode obter a Alisamicina a partir do caldo de cultura por absorção directa com absorventes adequados tais como a "Amberlite"® XAD-4 ou 7" (resina absorvente porosa à base de polistireno ou de ésteres de ácido acrílico- Rohm and Haas Co., U.S.A. "Diaion"® HP 20) resina absorvente de elevada porosidade à base de um polímero de polistireno/divinil-benzeno, Mitsubishi Chemical Industries, Japan; o absorvente preferido é a "Diaion"® HP-20". A eluição do composto de acordo com a presente invenção efectua-se a partir do absorvente utilizando fases móveis adequadas, tais como o metanol ou a acetona, qual-

quer delas isoladamente em combinação uma com a outra ou combinadas com a água e os produtos da eluição são depois submetidos a evaporação até à secagem. O eluente preferido é o etanol. Os produtos activos da eluição assim obtidos são reunidos e concentrados. Os produtos de eluição concentrados ou extratos anteriormente referidos contendo "Alisamicina" ainda podem ser purificados por diversas vias. Por exemplo, recorrendo a processos de reabsorção e eluição com bcarbono activado, "Amberlite" [®] XAD-4 pou 7" e "Diaion" [®] HP-20" filtração em gel com o gel "Sephadex" [®] LH-20" (Pharmacia Fine Chemicals AB, Suécia) e seus equivalentes cromatografia por absorção sobre alumina e gel de sílica, podendo todos estes processos ser combinados convenientemente com melhor purificação. Além disso, pode recorrer-se a utilização da cromatografia de camada fina, da cromatografia em líquido de pressão média e de pressão elevada com absorventes adequados tais como o gel de sílica e o gel de sílica C-18 modificado com sistemas solventes adequados. Por outro lado, também se obtêm bons resultados recorrendo a cromatografia em contra-corrente com um sistema solvente bifásico. De preferência utiliza-se normalmente a cromatografia sobre gel de sílica utilizando o acetato de etilo e o clorofórmio como solventes de eluição. Existe outro processo de purificação que pode ser utilizado isoladamente ou em combinação com os processos de purificação referidos antes, que se baseia na solubilidade diferencial da Alisamicina em solventes orgânicos. Os extratos ou produtos de eluição concentrados anteriormente referidos contendo Alisamicina podem ser precipitados com hexano, repetitivamente por um processo conhecido. Também se pode precipitar a Alisamicina a partir de metanol/água (99:1) para remoção das impurezas. Finalmente a Alisamicina pode cristalizar num solvente adequado ou numa mistura de solventes. O solvente preferencial é o acetonitrilo.

A Alisamicina é um pó cristalino amarelo ténuo, é fracamente solúvel em água, em metanol, em hexano e em éter de petróleo, é razoavelmente solúvel em acetonitrilo, em cloreto de metileno, em acetato de etilo e em clorofórmio. É bastante solúvel em propileno-glicol e em dimetil-sulfóxido.

Esse composto funde a uma temperatura superior a 250°C com decomposição.

Nos sistemas de cromatografia de camada fina (CCF) adiante referidos a Alisamicina apresentou os seguintes valores Rf:

Placa de CCF: placa pré-revestida de gel de sílica: Artigo No. 5554 da E. Merck, Darmstadt.

Rf da	EtOAc	CHCl ₃ :MeOH
Alisamicina	0,51	0,44

Nos resultados analíticos da cromatografia em líquido de elevada pressão (CLEP) efectuada utilizando as condições a seguir referidas obteve-se o valor RT=3,5 minutos

Carregamento da coluna: ODS-Hipersil[®] -10 µ, 4x3(30 + 100) mm

Débito : 1,0 ml/min
Detecção : 220 nm
Solvente : CH₃CN : 0,1% de ácido trifluoro-acético em água (55 : 45)

Dados espectroscópicos da Alisamicina

1. UV (CH₃OH): $\lambda_{\max}$ = 276 nm (log = 4,67) e 316 nm (log = 4.57)

2, IV (KBr): ver a Figura 1

3. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): Quadro A e Figura 2

4. RMN-¹³C (67,5 MHz, CDCl₃): Quadro B e Figura 3

5. Fórmula molecular: C₂₉H₃₂N₂O₇
confirmada por espectrometria de massa po BAR de elevada resolução

(matriz de
 álcool 3-nitrobenzílico, referência
 polietileno-glicol); $M + H^+$ (ião)
 medido: m/z 521.228; calculado
 521.229 para $^{12}C_{29}^{1}H_{33}^{14}N_2^{16}O_7$.

Quadro A: sinais de RMN- 1H da alisamicina
 (400 MHz, $CDCl_3$, $30^\circ C$; desvios químicos em ppm
 em relação ao TMS = 0)

Desvio químico	Multiplicidade (emparelhamentos em Hz)	Correspondência estrutural
1,13 (2H)	m	$7'-H_{ax} + 11'-H_{ax}$
1,18	m	$9'-H_{ax}$
1,28 (2H)	m	$8'-H_{ax} + 10'-H_{ax}$
1,67	m	$9'-H_{eq}$
1,73 (2H)	m	$8'-H_{eq} + 10'-H_{eq}$
1,76 (2H)	m	$7'-H_{eq} + 11'-H_{eq}$
2,10	m	$6'-H_{ax}$
2,53 (2H)	m	$5''-H_2$
2,61 (2H)	m	$4''-H_2$
2,83	1r	4-OH
3,65	d (3,6)	6-H
3,70	dd (2,6 + 3,6)	5-H
5,84	d (14,8)	$2'-H$
5,86	dd (14,5 + 10,3)	7-H
6,05	d (14,7)	12-H
6,12	m	$5'-H$
6,12	dd (10,5 + 15,5)	$4'-H$
6,42	ddd (11,2+14,8+0,3)	10-H

Quadro A (continuação)

Desvio químico	Multiplicidade (emparelhamentos em Hz)	Correspondência estrutural
6,58	dd (11,3 + 14,5)	8-H
6,58	dd (14,8 + 11,3)	9-H
7,22	ddm (14,8 + 10,5)	3'-H
7,32	dd (11,2 + 14,7)	11-H
7,40	d (2,6)	3-H
7,54	s	NH
7,58	s	NH
13,52	s	3"-OH

Quadro B: sinais de RMN-¹³C da Alisamicina

(67,5 MHz, CDCl₃, 30°C; desvios químicos em ppm e relação ao sinal do ¹³CDCl₃ = 77,0 ppm)

Desvio químico	Multiplicidade	Correspondência estrutural
25,65	t	C-4"
25,80 (2C)	t	C-8' + C-10'
26,00	t	C-9'
32,14	t	C-5"
32,25 (2C)	t	C-7' + C-11'
41,13	d	C-6'
52,93	d	C-5
57,41	d	C-6
71,20	s	C-4
115,01	s	C-2"
120,95	d	} C-4', C-5'
121,59	d	
125,52	d	} C-9, C-10
126,36	d	
128,08	s	C-2
131,58	d	} C-2', C-12
131,74	d	
136,29	d	C-8
139,52	d	C-7
143,45	d	} C-3', C-11
144,16	d	
150,76	d	C-3

Quadro B: (continuação)

Desvio químico	Multiplicidade	Correspondência estrutural
165,16	s	} C-1', C-13
165,48	s	
174,15	s	C-3"
188,63	s	C-1"
197,39	s	C-1

A Alisamicina é activa contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ao ser testado pelo método das vacuidades de agar em meio de ensaio antibiótico e através do método de diluição em agar de Mueller-Hinton (MIC) demonstrou uma actividade que se encontra enumerada no quadro I seguinte:

Quadro I

Organismo de ensaio	diâmetro de zona (mm)		MIC (µg/ml)
	500 µg/ml	32 µg/ml	
1. Staphilococcus aureus 209 p	26	18,5	1,6
2. Staphylococcus aureus 20424	25	19	3,2
3. Staphylococcus aureus E88	27	14	6,4
4. Streptococcus faecalis UD8b	16	13	>50
5. Streptococcus faecalis Eder	23	16	6,4

Quadro I (continuação)

Organismo de ensaio	Diâmetro de zona (mm)		MIC (μ g/ml)
	500 μ g/ml	32 μ g/ml	
6. Streptococcus faecalis 23241	22	13	6,4
7. Escherichia coli 9632	-	-	50
8. Candida albicans	10	-	50
9. Pericularia oryzae	15	11	50
10 Botrytis cinerea 47	20	-	50

Para além da actividade anti-bacteriana descobriu-se que a Alisamicina possui também actividades anti-tumor e anti-parasítica.

Seguidamente ilustrar-seá a presente invenção através de exemplos os quais não devem ser considerados como limitativos.

Exemplo

Isolamento da estirpe Streptomices sp. Y-88,31582 através do solo.

(a) Preparação do meio de isolamento.

Meio 1:	Glicose	...	1,0 g
	Glicerol	...	1,0 g
	L-arginina	...	0,3 g
	K ₂ HPO ₄	...	0,3 g
	MgSO ₄ · 7H ₂	...	0,2 g
	NaCl	...	0,3 g
	Extracto de levedura...		2,0 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	...	10,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	...	1 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	...	1 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	...	1 mg
Ágar	...	15,0 g
Água destilada	...	1 litro
pH	...	6,5

Meio 2:	Glucose	...	2,0 g
	L-asparagina	...	1,0 g
	K_2HPO_4	...	0,5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	...	0,5 g
	Extracto de solo	...	200 ml
	Ágar	...	15,0 g
	Água destilada	...	800 ml
	pH	...	8,0

Meio 3:	Amido	...	10,0 g
	Caseína	...	0,3 g
	KNO_3	...	2,0 g
	NaCl	...	2,0 g
	K_2HPO_4	...	2,0 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	...	0,05 g
	CaCO_3	...	0,02 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	...	0,01 g
	Ágar	...	15,0 g
	Água destilada	...	1 litro
	pH	...	7,2-7,5

Esterilizou-se o meio à temperatura de 121°C

durante 30 minutos. Em todos os casos o meio esterilizado foi arrefecido para a temperatura de 45°C e vertido em placas de Petri e deixou-se solidificar.

(b) Preparação da suspensão de solo

Com 1 g de solo preparou-se uma suspensão de água destilada e agitou-se muito bem. Deixou-se o solo sedimentar e utilizou-se o fluído sobrenadante para inocular simultaneamente cada um dos meios de isolamento anteriormente referidos.

(c) Inoculação do meio de isolamento

Utilizou-se 1 ml de suspensão de solo e procedeu-se a inoculação das Placas de Petri contendo 50 ml de qualquer dos meios de isolamento de nutrientes anteriormente referidos.

(d) Isolamento da estirpe Streptomices sp. Y-88,31582

Utilizou-se placas de [Petri inoculadas as quais foram incubadas a temperatura de 30°C durante 10 dias e depois isolou-se a estirpe sp. Y-88,31582 entre os microrganismos em desenvolvimento.

Exemplo II

Preparação de uma cultura de estirpe Streptomices sp. Y-88,31582 para a produção de Alisamicina por fermentação .

Manteve-se a estirpe Streptomices sp. Y-88,31582 em extrato de levedura/extrato de malte com a composição seguinte:

Extracto de malte	...	10,0 g
extracto de levedura	...	4,0 g
Glucose	...	4,0 g
Água	...	15,0 g
Água destilada	...	1 litro
pH	...	7,0

Fez-se a distribuição do meio por tubos de ensaio e procedeu-se a esterilização à temperatura de 121°C durante 30 minutos. Os tubos foram depois arrefecidos em posição inclinada para a preparação de planos inclinados de ágar. Esses planos inclinados foram inoculados com a cultura e fez-se a incubação à temperatura de 28°C durante um período de 10-15 dias, momento em que se observou bom crescimento e boa esporulação. Utilizou-se uma suspensão de esporos, provenientes de um plano inclinado, em água destilada para inocular 5 balões de Erlenmeyer com a capacidade de 500 ml contendo cada um deles 100 ml do meio de cultura inoculado.

Composição do meio de cultura inoculado

Glucose	...	15,0 g
Farinha de soja	...	15,0 g
Licor de infusão de cereais	...	5,0 g
CaCO ₃	...	2,0 g
NaCl	...	5,0 g
Água destilada	...	1 litro
pH	...	6,5

Distribuiu-se o meio anterior em quantidades de 100 ml por balões de Erlenmeyer com a capacidade de 500 ml e fez-se a esterilização à temperatura de 121°C durante 30 minutos. Deixou-se os frascos arrefecer e inoculou-se com uma suspensão de esporos ou com bujões de micélius e agitou-se a 240 r.p.m. durante 72 h. à temperatura de 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) num agitador centrífugo com um diâmetro de 37,5 mm. Utilizou-se a colheita resultante para inocular 200 balões com a capacidade de 500 ml contendo cada um deles 100 ml de um meio de cultura de produção a 2-4 % (v/v).

Composição do meio de produção

Sacarose	...	20,0 g
CaCO ₃	...	2,5 g
KNO ₃	...	1,0 g
K ₂ HPO ₄	...	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	...	0,5 g
NaCl	...	0,5 g
Água destilada	...	0,5 g
pH	...	7,0

Efectuou-se a fermentação à temperatura de 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) utilizando um agitador centrifugo a 240 r.p.m., com o diâmetro de 37,5 mm. Depois de interrompida a fermentação decorridas 40-44 horas, verificou-se que o diâmetro da zona de inibição em relação à estirpe *Staphylococcus aureus* 209 P era de 20 mm, tendo-se feito o teste do filtrado da cultura pelo método das cavidades de ágar (6 mm de diâmetro) e constatou-se que o valor do pH do fluido da cultura variava entre 7,1 e 7,3. O volume celular carregado foi de 20 % (v/v). Submeteu-se a centrifugação o caldo de cultura recolhido contendo o antibiótico para se efectuar a separação dos micélius e o fluido da cultura e depois efectuou-se o processamento conforme descrito no exemplo IV.

Exemplo 3

Preparação de uma cultura da estirpe *Streptomyces* sp. Y-88,31582 para a produção de Alisamicina por fermentação.

Repetiu-se o procedimento do exemplo II com as diferenças seguintes:

O desenvolvimento da estirpe *Str.* sp. Y-88,31582 foi efectuado em meio de ágar com a composição se-

guinte:

Amido (solúvel)	...	10,0 g
K_2HPO_4	...	1,0 g
$MgSO_4$	...	1,0 g
NaCl	...	1,0 g
$(NH_4)_2SO_2$	...	2,0 g
$CaCO_3$	...	2,0 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	...	0,1mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	...	0,1 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	...	0,1 mg
Ágar	...	15,0 g
Água destilada	...	1 litro
pH	...	7,2

A composição do meio de cultura inoculado e o meio de cultura de produção foram idênticos aos do exemplo II.

Adicionou-se 2 ml de agente anti-espumante desmofene. Colocou-se 10 litros de um meio de produção num fermentador com a capacidade de 15 litros. Esterilizou-se o meio por acção directa e indirecta de vapor durante 20 minutos à temperatura de $121^{\circ}C$. Deixou-se o fermentador arrefecer e fez-se a inoculação com uma cultura adequada (9 % v/v). Efectuou-se a fermentação à temperatura de $27^{\circ}C$ ($\pm 1^{\circ}C$) sob condições de agitação a 150 r.p.m. com arejamento com um débito de 10 litros por minuto. Depois de interrompida a fermentação decorridas 23-27 h. ajustou-se o valor do pH da cultura para 7,3 e verificou-se que o diâmetro da zona de inibição em relação à estirpe *Staphylococcus aureus* 209 P era de 21 mm ao fazer-se o teste do filtrado da cultura pelo método das cavidades de agar (6 mm de diâmetro). O volume celular carregado foi de 15 %. Efectuou-se o processamento do caldo de cultura conforme descrito no exemplo V.

Exemplo IV

Isolamento e purificação da Alisamicina

extraiu-se duas vezes cerca de 16 litros de filtrado de cultura tal como obtido no Exemplo II, utilizando de cada vez 10 litros de acetato de etilo e ajustando o valor de pH para 7,0. Procedeu-se à eliminação das camadas aquosas e submeteu-se à evaporação os extractos de acetato de etilo combinados, sob condições de vácuo até à secagem. Dissolveu-se este extrato impuro numa quantidade mínima de acetato de etilo e provocou-se a precipitação com hexano. Repetiu-se o procedimento duas vezes para se obter um pó seco (0,5 g). Dissolveu-se novamente esse pó numa quantidade mínima de acetato de etilo e adicionou-se-lhe cerca de 50 ml de metanol. Depois adicionou-se cerca de 0,5 ml de água duplamente destilada e deixou-se a solução em repouso durante 16 horas à temperatura de -20°C . Dissolveu-se o precipitado resultante em acetonitrilo. Concentrou-se a solução de acetonitrilo até à saturação e manteve-se a temperatura de -20°C durante um período de 48 horas. Obteve-se deste modo 150 mg de Alisamicina cristalina pura.

Exemplo V

Isolamento e purificação da Alisamicina

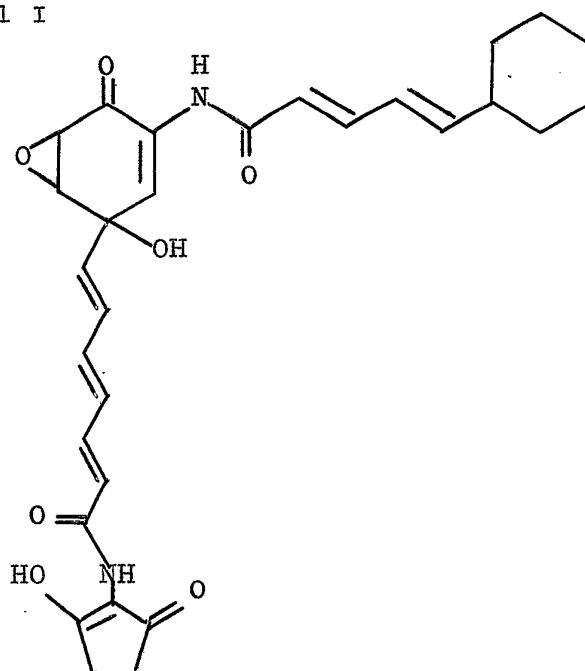
Juntou-se os filtrados de cultura de dois lotes do fermentador, conforme descrito no exemplo III, para se obter um volume de 17 litros. Efectuou-se a extracção duas vezes utilizando de cada vez 10 litros de acetato de etilo, para um valor de pH 7,0. Concentrou-se o extracto de acetato de etilo até à secagem para proporcionar 4,5 g de composto impuro. Dissolveu-se esse composto impuro numa quantidade mínima de acetato de etilo e provocou-se a precipitação com hexano. Repetiu-se este procedimento três vezes para se obter um pó seco (1,2 g) o qual foi carregado numa coluna de vidro com as dimensões de 8 por 15 cm e empacotado numa coluna com 400 g

de gel de sílica (malha 100-200). Fez-se a eluição da Alisamicina utilizando clorofórmio/acetato de etilo com um gradiente variável entre (70:30) e (65:35). Procedeu-se a concentração dos produtos activos de eluição (1,5 litros) contendo a Alisamicina, até à secagem (0,42 g) e depois dissolveu-se numa quantidade mínima de acetato de etilo tendo-se adicionado cerca de 50 ml de metanol. Depois adicionou-se cerca de 0,5 ml de água duplamente destilada a essa solução metanólica e manteve-se a solução à temperatura de -20°C durante um período mínimo de 16 horas. Dissolveu-se o precipitado resultante numa quantidade mínima de acetato de etilo e depois adicionou-se 50 ml de acetoneitrilo. Manteve-se a solução de acetoneitrilo à temperatura de -20°C durante um período mínimo de 48 horas. Obteve-se deste modo uma quantidade de 110 mg de Alisamicina cristalina pura de cor amarelada.

= R E I V I N D I C A Ç Õ E S =

- 1ª -

Processo para a preparação de alisamicina de fórmula geral I



I

caracterizado por se fazer uma cultura de actinomicetes Y-8831582 (DSM 5559) sob condições aeróbicas num meio nutriente que contem fontes de carbono, de azoto, sais inorgânicos nutrientes e elementos raros.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se efectuar a cultura a uma temperatura compreendida entre 18 e 40°C.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, ou 2 caracterizado por se efectuar a cultura a um pH compreendido entre 6 e 9.

- 4ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações anteriores, caracterizado por se efectuar a cultura a uma temperatura de 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e a um pH de cerca de 7.

- 5ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações anteriores, caracterizado por se efectuar a cultura durante um período superior a 23 horas.

- 6ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações anteriores caracterizado por se efectuar a cultura como uma cultura submersa.

- 7ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se incorporar como ingrediente

activo um composto de fórmula I quando preparado de acordo com as reivindicações anteriores em associação com veículos e/ou auxiliares habituais numa forma adequada para administração a um paciente.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente europeia apresentado em 12 de Janeiro de 1990 sob o No. 90100591.8.

Lisboa, 10 de Janeiro de 1991.

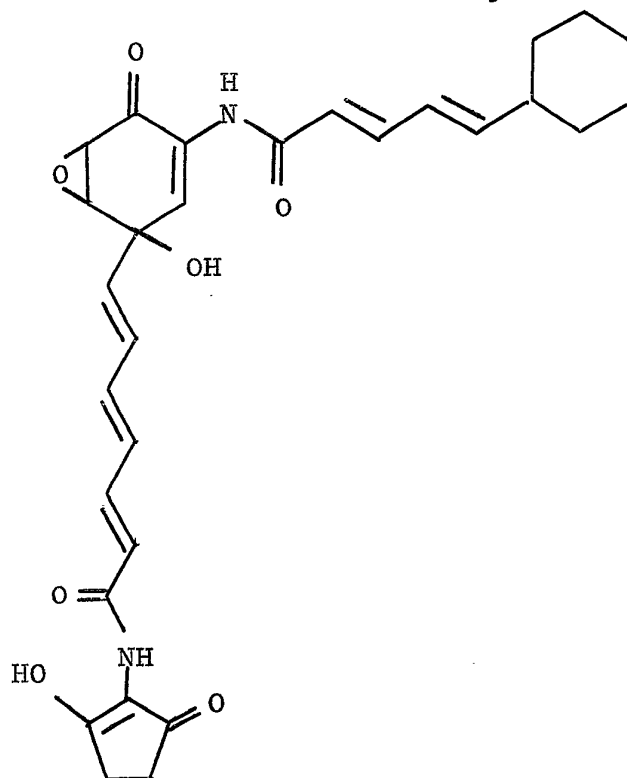
~~REQUERENTE: INSTITUTO DE INVESTIGACAO E DESENVOLVIMENTO~~

A handwritten signature in dark ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned below the text of the document.

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ALISAMICINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de alisamicina com a fórmula geral



I

que compreende fazer-se uma cultura de actinomicetes Y-8831852 (DSM 5559) sob condições aeróbicas num meio nutriente que contém fontes de carbono, de azoto, sais inorgânicos nutrientes e elementos raros.