

Int. Cl.<sup>2</sup>: C04G



Nº 400.225

**400225**

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C
CLASE _____
SUBCLASE _____

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un.a

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: MERCK & CO., INC.

RESIDENCIA: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY,

New Jersey, USA.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA RECUPERAR EL ANTIBIOTICO ACIDO 7- $\beta$ -(D-5-AMINO-5-CARBOXIVALERAMIDO)-3-(CARBAMOLLOXIMETIL)-7-METOXI-3-CEFEM-4-CARBOXILICO".

Prioridad: Patente Estadounidense n.º 120.706 del 3-3-71

400225



ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1 Se obtienen nuevos y útiles antibióticos cultivando variedades de un microorganismo particular en medios nutritivos acuosos adecuados, bajo condiciones controladas.

5 En general, antes de que estos antibióticos sean de valor práctico, deben ser obtenidos en forma purificada, sustancialmente exenta de otras materias orgánicas, así como de diversos compuestos inorgánicos que se encuentran en los caldos de fermentación o en sus concentrados. Esta invención se dirige a los métodos de recuperación de este antibiótico en forma purificada.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15 Esta invención se refiere a un método en múltiples etapas para recuperar y purificar la nueva sustancia antibiótica ácido 7- $\beta$ -(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carbamoyloximetil)-7-metoxi-3-cefen-4-carboxílico o sus sales, a partir de las soluciones acuosas que contienen dicho antibiótico, poniendo en contacto en primer lugar el caldo de fermentación en el que ha sido producido el antibiótico con una resina cambiadora de catión para adsorber el antibiótico en dicha resina y, en segundo lugar, eluyendo el antibiótico del adsorbato de resina con una base débil, ya sea una solución acuosa de una base orgánica o de una base inorgánica; en tercer lugar, poniendo en contacto los eluatos concentrados con una resina cambiadora de anión débilmente básica, para adsorber el antibiótico en dicha resina; en cuarto lugar, lavando la resina con una solución diluida de un ácido alcánico inferior para separar las impurezas de la resina; y finalmente, eluyendo el antibiótico sustancialmente puro del adsorbato de resina, utilizando una base débil o

POOR  
QUALITY

400225

28



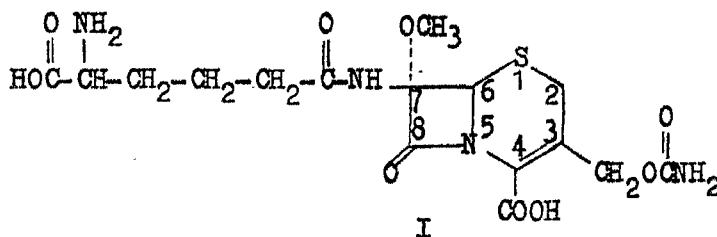
1 una solución reguladora. La solución reguladora puede ser cualquiera de los tampones acuosos comunes en un intervalo de pH de 4,5 a 9,5. Por ejemplo, pueden utilizarse tampones de fosfato, acetato, borato y citrato.

5 El orden de las etapas y los diversos reactivos empleados son críticos para obtener un rendimiento máximo. Cada etapa será descrita ahora con mayor detalle.

10 El antibiótico ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivaleramide)-3-(carbamoyloximetil)-7-metoxi-3-cefen-4-carboxílico y sus sales son eficaces para inhibir el crecimiento de varios microorganismos gram-negativos y gram-positivos.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

15 El ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivaleramide)-3-(carbamoyloximetil)-7-metoxi-3-cefen-4-carboxílico, que responde a la Fórmula I dada más adelante, es producido durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones controladas, por una variedad de Streptomyces lactandurans capaz de producir dicho compuesto, por ejemplo por la variedad colocada en depósito permanente no restringido en la colección de cultivos de la Northern Utilization Research and Development Branch del Departamento de Agricultura de Estados Unidos en Peoria, Illinois, bajo el número de accesión NRRL 3802 y es activo en la inhibición del crecimiento de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.



400225

28 FEB 1972



1 Este compuesto es anfótero, con un punto isoelectrico aparente a pH 3,5 aproximadamente y presenta la máxima estabilidad en solución en un intervalo de pH comprendido entre 1,5 y 9,0 aproximadamente.

5 El caracter anfótero de este compuesto permite el uso de resinas cambiadoras de ión, catiónicas y aniónicas, en la purificación del compuesto. Sin embargo, debido a la complejidad del caldo de fermentación crudo, se encuentran presentes otras muchas sustancias ácidas y/o básicas.

10 Per lo tanto, un objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento de purificación que dé lugar al aislamiento del producto final con un alto rendimiento, empleando un pequeño número de etapas de manipulación. Otro objeto de esta invención es aislar el producto final en  
15 una forma que pueda ser utilizada directamente como antibiótico o en nuevas síntesis químicas, sin modificación química adicional.

Mediante esta invención, se ha encontrado que el ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefen-4-carboxílico y sus sales pueden ser  
20 purificados mediante el uso de un proceso de purificación en múltiples etapas.

El material de partida que ha de ser purificado se encuentra en forma de caldo de fermentación crudo. También  
25 pueden utilizarse en este proceso los caldos parcialmente purificados; sin embargo, la ventaja de este procedimiento reside en que no es necesario someter el caldo crudo a un tratamiento preliminar.

El caldo que contiene el antibiótico se hace pasar  
30 por una columna cambiadora de ión catiónica. Una resina típica



1 ca es del tipo de sulfonato con una matriz de estireno-divi-  
nilbenceno, por ejemplo la resina de ácido poliestirensulfó-  
nico nuclear Dowex 50 en el ciclo de hidrógeno. Preferimos  
emplear Dowex 50 x 4, que significa que la resina contiene  
5 un 4 % de reticulación. Pueden utilizarse otras resinas de  
ácido sulfónico comerciales.

El caldo se ajusta a un valor de pH inferior a 7,  
comprendido entre 1,5 y 7 aproximadamente, antes de ponerlo  
en contacto con la resina. Con preferencia, el pH es ajusta-  
10 do a 2-4 mediante la adición de pequeñas cantidades de cual-  
quier ácido orgánico o inorgánico. Los ácidos preferidos son  
fosfórico, clorhídrico o sulfúrico, aunque evidentemente es-  
ta elección no es crítica.

El adsorbato en resina resultante es después eluí-  
15 do con una solución acuosa de una base débil. La concentra-  
ción del eluyente es de 0,1-2,0 M. La elección de la base  
no es indebidamente crítica y puede ser una base orgánica  
como piridina, trialquilamina como trietilamina, una picoli-  
na, trietanolamina o una lutidina o una solución acuosa de  
20 una base orgánica o inorgánica como  $\text{NH}_4\text{OH}$ . El eluyente pre-  
ferido es una base orgánica volátil, ya que entonces puede  
ser separado fácilmente. Es especialmente preferida la pi-  
ridina.

Los eluatos se recogen en fracciones, dependiendo  
25 la magnitud de la fracción del tamaño de la columna emplea-  
da. La bioactividad de los eluatos es medida por valoración  
de los mismos mediante un ensayo que utiliza Vibrio percolans  
como organismo de ensayo. Después se concentran las fraccio-  
nes que contienen la mayor parte del material activo, gene-  
ralmente a vacío, para separar cualquier base volátil y los  
30

400225 28



1 disolventes orgánicos. Naturalmente, esta purificación em-  
pleando la resina cambiadora de catión no se limita a los  
caldos de fermentación sino que puede ser empleada con  
cualquier solución impura del compuesto de Fórmula I.

5 A continuación este concentrado es ajustado a  
un pH de 5-7 aproximadamente y pasado por una resina cam-  
biadora de anión del tipo débilmente básico, tal como una  
resina de amina terciaria sobre una matriz acrílica o sobre  
una matriz de estireno-divinilbenceno. Un ejemplo de las  
10 primeras es la resina IRA-68, en el ciclo de cloruro, for-  
miato o acetato. Para esta resina, se ha encontrado que el  
pH óptimo está comprendido entre 6 y 7, aunque el pH no es  
indebidamente crítico.

15 El adsorbato en resina resultante es después "la-  
vado" con una solución acuosa diluida de un ácido alcanico  
inferior. Por el término "ácido alcanico inferior" se en-  
tiende preferiblemente un ácido que contenga de 1 a 5 áto-  
mos de carbono. La especie preferida es el ácido acético.  
Aunque no deseamos quedar ligados por ninguna teoría, la  
20 "etapa de lavado" crea una competencia por los centros bá-  
sicos de la resina. Las sustancias menos ácidas que son im-  
purezas del producto antibiótico son separadas por esta eta-  
pa de lavado con ácido pero, sorprendentemente, el antibió-  
tico básico permanece adsorbido sobre la resina. Por lo tan-  
25 to, esta combinación de adsorción y lavado aumenta conside-  
rablemente la pureza del producto final.

Hemos encontrado que la solución acuosa del ácido  
alcanico inferior actúa a una concentración comprendida en-  
tre 0,1 y 1,0 M, preferiblemente entre 0,5 y 0,75 M. Natural-  
30 mente, el volumen total del "lavado" ácido es función del te

400225

28

28



1 maño de la columna y puede ser determinado experimentalmen-  
te. Por ejemplo, hemos encontrado que con cinco volúmenes  
de columna se separan el 90 % de las impurezas, con una  
pérdida inferior al 6 % de sustancia activa. Pueden emplear  
5 se de 3 a 10 volúmenes de la columna de lavado ácido.

El adsorbato en resina "lavado" es eluido después  
satisfactoriamente con diversas sustancias. Un método pre-  
ferido consiste en emplear una base orgánica débil, o una  
sal de la misma, como piridina o hidrocioruro de piridina,  
10 en solución acuosa.

Otro eluyente es una solución acuosa reguladora  
de fosfato inorgánico, a un pH de 8 aproximadamente.

Las fracciones del eluato que contienen el mate-  
rial activo han sido identificadas por el ensayo antes des-  
15 crito. En general, la mayor parte de la actividad es recupe-  
rada en las fracciones 1-7 de eluato y un intervalo todavía  
más estrecho es el de las fracciones 2-5.

Después el antibiótico purificado puede ser recu-  
perado del eluyente, por ejemplo por evaporación, pero tam-  
20 bién puede ser tratado químicamente para formar derivados  
químicos antibióticamente activos.

El compuesto antibiótico de Fórmula I anterior y  
sus sales presentan resistencia no solamente a la penicili-  
nasa sino también a las cefalosporinasas y presentan una  
25 mayor actividad contra los microorganismos Gram-negativos.  
A diferencia de la cefalosporina C, que tiene una actividad  
antibacteriana relativamente baja, los productos de esta  
invención presentan un significativo efecto Gram-negativo  
30 in vivo, con una potencia que, en general, es superior a  
la de la cefalotina. Esta actividad incluye la eficacia

400225



1 in vivo sobre Proteus morganii y, además, eficacia contra  
las siguientes bacterias Gram-negativas: Escherichia coli,  
Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Salmonella schottmue-  
5 lleri, Klebsiella pneumoniae AD, Klebsiella pneumoniae B y  
Paracolebactrum arizoniae.

Los bioensayos para este antibiótico se realizan  
por un procedimiento de disco-placa, empleando discos de pa-  
pel de filtro de 0,5" (12,7 mm). Las placas de ensayo se  
preparan utilizando ágar nutritivo Difco más extracto de le-  
10 vadura Difco a una concentración de 2,0 g/litro, a razón de  
10 ml por placa. Un crecimiento de toda una noche del orga-  
nismo de ensayo Vibrio percolans ATCC 8461 es diluido en  
solución salina estéril hasta una suspensión con una trans-  
mitancia del 40 % a una longitud de onda de 660 mμ. Esta sus-  
15 pensión se agrega a 20 ml/litro de medio antes de verterla  
en las placas.

Las placas de ensayo se mantienen a 4°C hasta que  
son utilizadas (5 días como máximo). Después de la aplicación  
de los discos de ensayo saturados de antibiótico, las placas  
20 son incubadas a 28°C durante un periodo comprendido entre 8  
y 24 horas. Las zonas de la inhibición son medidas como milí-  
metros de diámetro. Se utilizan para determinar las potencias  
relativas o, cuando se comparan con un patrón de referencia  
purificado, la potencia en μg/ml.

25 El ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(car-  
bamiloiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico es producido  
durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos  
adecuados, en condiciones controladas, por inoculación con el  
organismo Streptomyces lactamdurans NRRL 3802. Los medios acuo-  
30 sos como los empleados para la producción de otros antibióti-

400225

28



1       cos son adecuados para producir el antibiótico ácido 7-β-  
      (D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-me-  
      toxi-3-cefem-4-carboxílico. Estos medios contienen fuentes  
5       de carbono y nitrógeno asimilables por el microorganismo y  
      sales inorgánicas.

      En general, pueden utilizarse hidratos de carbono  
      como azúcares, por ejemplo, glucosa, arabinosa, maltosa, ra-  
      finosa, xilosa, manitol y similares y almidones como los  
10       granos, por ejemplo avena, centeno, almidón de maíz, harina  
      de maíz y similares, solos o en combinación, como fuentes de  
      carbono asimilable en el medio nutritivo. La cantidad exac-  
      ta de la fuente o fuentes de hidrato de carbono utilizada en  
      el medio depende en parte de los restantes ingredientes del  
15       mismo pero, en general, la cantidad de hidrato de carbono  
      varía habitualmente entre 1 % y 6 % del peso del medio apro-  
      ximadamente. Estas fuentes de carbono pueden ser utilizadas  
      individualmente o pueden combinarse en el medio varias fuen-  
      tes de carbono. En general, como fuente de nitrógeno en el  
20       proceso de fermentación puede utilizarse cualquier material  
      proteínáceo. Las fuentes de nitrógeno adecuadas son, por ejem-  
      plo, hidrolizados de levadura, levadura Amber, harina de so-  
      ja, hidrolizados de caseína, líquido de infusión de maíz, so-  
      lubles de destilería o pasta de tomate y similares. Las fuen-  
      tes de nitrógeno, solas o en combinación, se utilizan en  
25       proporciones que oscilan aproximadamente entre 0,2 y 6 % del  
      peso del medio acuoso.

      La fermentación se lleva a cabo a temperaturas com-  
      prendidas entre 20° y 37°C aproximadamente; sin embargo, pa-  
30       ra obtener los mejores resultados, es preferible efectuar la  
      fermentación a temperaturas comprendidas entre unos 24° y

400225



1 32°C aproximadamente. El pH de los medios nutritivos adecuados para desarrollar el cultivo de Streptomyces lactamdurans y producir el antibiótico debe estar comprendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

5 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrativos y no limitativos de la invención.

EJEMPLO 1

Etapa A: Fermentación

10 Se utiliza un tubo liofilizado de cultivo de Streptomyces lactamdurans (NRRL 3802) para inocular 50 ml de Medio I estéril en un Erlenmeyer de 200 ml provisto de tabiques.

Medio I

15	Autolizado de levadura (Ardamine)	10,0 g
	Glucosa	10,0 g
	Solución reguladora de fosfato <sup>¶</sup>	2,0 ml
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g
	Agua destilada	1000,0 ml
	pH	6,5

20 <sup>¶</sup> Solución reguladora de fosfato:

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	91,0 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	95,0 g
	Agua destilada	1000,0 ml

25 A continuación el matraz inoculado se introduce en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un recorrido de 2" (5 cm) y se incuba durante 72 horas a 28°C.

30 A continuación, empleando pipetas estériles, se transfieren partes alícuotas de 5 ml (10 % de inoculum) de este cultivo a 4 matraces de siembra de segunda fase, del

400225

28 FEB 1972



1 mismo tamaño y conteniendo el medio antes descrito y estos  
 2 matracas son después sacudidos en la forma antes indicada.  
 3 Los matracas de siembra de segunda fase son después reunidos  
 4 asépticamente en un solo matraz y utilizados para inocular  
 5 11 erlenmeyers de 2 litros, provistos de tabiques, conteniendo  
 6 do cada uno de ellos 350 ml de Medio II con 2-3 % de ino-  
 7 culum, empleando pipetas estériles. El Medio II tiene la si-  
 8 guiente composición:

Medio II

10	Levadura Amber nº 300	10,0 g
	Solubles de destilería	20,0 g
	Dextrosa	10,0 g
	Agua destilada	1000,0 ml
	pH	7,0

15 Los matracas de producción son después sacudidos  
 16 a 28°C en un sacudidor que funciona a 145 rpm, con un reco-  
 17 rrido de 2" (5 cm), durante 4 días. Al final del periodo de  
 18 incubación, se combinaron los contenidos de 20 de estos ma-  
 19 tracas y una muestra fué centrifugada para separar el mico-  
 20 lio.

Etapa B: Adsorción sobre una resina cambiadora de catión

25 Una columna de resina Dowex 50-X-4 (una resina can-  
 26 biadora de catión, fuertemente ácida, del tipo de sulfonato  
 27 con una matriz de estireno-divinilbenceno), en el ciclo de  
 28 hidrógeno, de 103 cm de altura y 12,44 cm de diámetro (con-  
 29 teniendo 480 ml de resina), fué lavada para soltar y sepa-  
 30 rar los finos.

El caldo preparado en la Etapa A es filtrado. La actividad de los sólidos es de 60-100 unidades/mg.

Cinco litros (alrededor de 10 volúmenes de colum-

400225

28



1 na) del caldo filtrado, ajustado a pH 2,5, son bombeados a través de la columna de resina a razón de unos 60 ml/minuto y el caldo agotado es recogido. Después de lavar con 1 litro de agua, la columna queda preparada para la elución.

5 Etapa C: Elución

El eluyente es piridina 0,5 M en agua. La solución de piridina se pasa por la columna a razón de 40 ml/minuto y se recogen muestras de 100 ml. Se combinan las fracciones que contienen el producto I biológicamente activo. En las fracciones activas se recupera el 94 % de la actividad biológica.

10 El eluato contiene la sal de piridinio del ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. Las fracciones combinadas se concentran en un evaporador rotatorio hasta unos 100 ml. Un precipitado sólido pardo se separa por filtración y el filtrado y las aguas de lavado se concentran de nuevo hasta unos 30 ml. El pH se ajusta desde 4 aproximadamente a 7 con 3 ml de hidróxido sódico 2,5 N. y el volumen se lleva a 100ml.

20 Etapa D: Adsorción sobre una resina cambiadora de anión, débilmente básica

Una columna de 250 ml de IRA-68, resina débilmente básica de amina terciaria sobre una matriz acrílica, se convierte en su forma acetato. El concentrado preparado en la Etapa C se hace pasar por la columna a razón de 10 ml/minuto. La columna se lava con 250 ml de agua y después con 1250 ml de ácido acético 0,5 M.

25 Etapa E: Elución con piridina

30 Después la columna se lava con 250 ml de agua y a continuación se eluye con piridina 0,5 M. Los cinco prime-

400225 28 FEB 1977



1 ros volúmenes de columna contienen alrededor del 70 % de la  
actividad biológica. Cuando son liofilizados, se obtienen  
325 mg de un sólido pardo claro que es identificado como la  
sal de piridina del ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamilo-  
5 ximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico,  
con una actividad de 5400 unidades/mg.

EJEMPLO 2

10 Las Etapas A a D del Ejemplo 1 se realizan sustan-  
cialmente en la forma descrita. En la última Etapa E de elu-  
ción se emplea un eluyente a base de solución reguladora de  
fosfato en lugar del eluyente de piridina del Ejemplo 1.

15 La solución reguladora de fosfato se prepara di-  
solviendo 14,2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 100 ml de agua (a) y 13,2 g  
de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 100 ml de agua (b). Se trata de soluciones mola-  
res. Se mezclan 75 ml de (a) y 5 ml de (b) y se diluyen has-  
ta 1600 ml para dar una solución reguladora de fosfato  
0,05 M aproximadamente, de pH 8.

20 Después la columna de IRA-68 es eluída con la so-  
lución reguladora de fosfato descrita. Alrededor del 73 %  
de la actividad biológica se encuentra en 4 volúmenes de co-  
lumna de eluato. Esta actividad biológica es debida a la pre-  
sencia de ácido 7-β-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carba-  
moiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico.

25 En resumen, la Patente de Invención que se soli-  
cita deberá recaer sobre las siguientes:

30

400225 28



REIVINDICACIONES

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

1. Un procedimiento para recuperar el antibiótico ácido 7- $\beta$ -(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo de las soluciones acuosas impuras que contienen dicho antibiótico, cuyo procedimiento consiste en: (1) pasar un caldo de fermentación o una solución que contenga dicho antibiótico a través de una resina cambiadora de catión ácida; (2) eluir el adsorbato en resina con una base débil; (3) pasar los eluatos a través de una resina cambiadora de anión débilmente básica; (4) lavar la resina adsorbida con una solución acuosa diluida de un ácido alcanoico inferior; (5) eluir la resina adsorbida con una solución de eluyente básico débil o con una solución reguladora; y (6) recoger los eluatos, combinar las fracciones activas y separar los disolventes, con lo que se obtiene el producto.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la resina cambiadora de anión está compuesta por grupos cambiadores de amina terciaria unidos a una red de polímero acrílico.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la resina cambiadora de catión está constituida por grupos cambiadores de ácido sulfónico nuclear unidos a una red de polímero de estireno-divinilbenceno.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la solución eluyente básica débil de la Etapa (2) es piridina acuosa.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el ácido alcanoico inferior es ácido acético.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1,



400225

24 JUN 72

1

en el que el eluyente básico débil de la Etapa (5) en piridina.

5

7. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el eluyente de la Etapa (5) es una solución acuosa reguladora de fosfato.

10

8. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA RECUPERAR EL ANTIBIOTICO ACIDO 7- $\beta$ -(D-5-AMINO-5-CARBOXIVALERAMIDO)-3-(CARBAMOILOXIMETIL)-7-METOXI-3-CEFEM-4-CARBOXILICO".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de quince páginas mecanografiadas.

15

Madrid, 28 de Febrero de 1.972

BERNARDO UNGRIA

P.P.

20

25

30