



Int. Cl.: C 125

402903

No. 402.903

M E M O R I A   D E S C R I P T I V A

correspondiente a la solicitud de una

P A T E N T E   D E   I N V E N C I O N

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Residencia: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey,  
U.S.A.

Enunciado: MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE  
PREPARACION DE ACIDO 7-(D-5-AMINO-5-CARBOXI  
VALERAMIDO)-3-(CARBAMOILOXIMETIL)-7-METOXI-  
3-CEFEM-4-CARBOXILICO.

Prioridades: de las solicitudes de patente estadounidenses  
No. 145.558 del 20 de mayo de 1971 y No.203.838  
del 1 de diciembre de 1971.

→ - - -

TE.

402903

=2



1

RESUMEN DE LA INVENCION

Se obtienen mayores rendimientos del antibiótico ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico por adición de tiosulfato sódico y/o de ácido  $\alpha$ -aminoadípico o ditionito sódico a los medios de fermentación constituidos por nutrientes orgánicos complejos o químicamente definidos. El antibiótico que es producido cultivando variedades recién encontradas de Streptomyces sobre medios de fermentación adecuados es activo contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

10

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Esta invención se refiere a la producción de un nuevo y útil antibiótico conocido químicamente por ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico y, en particular, a un método mejorado para la producción del antibiótico por fermentación de medios nutritivos con variedades adecuadas de microorganismos como, por ejemplo, Streptomyces.

15

20

25

El antibiótico es producido durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones controladas. Son adecuados los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos. Estos medios contienen fuentes de carbono y nitrógeno que son asimilables por el microorganismo y sales inorgánicas. Además, los medios de fermentación contienen trazas de metales

402903 - 2



1 necesarios para el desarrollo del microorganismo, que son  
comúnmente proporcionados como impurezas accidentales de los  
otros constituyentes del medio. En general, los hidratos de  
5 carbono como azúcares, por ejemplo sacarosa, maltosa, fructosa,  
lactosa y similares y almidones como granos, por ejemplo  
avena y centeno, almidón de maiz, harina de maiz y similares,  
pueden ser utilizados solos o en combinación como  
fuentes de carbono asimilable. La cantidad exacta de la fuente  
10 o fuentes de hidrato de carbono utilizada en el medio dependerá  
en parte de los otros ingredientes. Sin embargo, se ha encontrado  
que es suficiente una cantidad del hidrato de carbono comprendida  
aproximadamente entre 1 y 6 % del peso del medio. Puede utilizarse  
una sola fuente de carbono o pueden combinarse varias fuentes.

15 Las fuentes de nitrógeno satisfactorias comprenden miles de materias  
proteicas como diversas formas de hidrolizados de caseína, harina  
de soja, licor de infusión de maiz, solubles de destilería, productos  
de levadura, pasta de tomate y similares. Las diversas fuentes de  
20 nitrógeno pueden ser utilizadas solas o en combinación y se emplean  
en cantidades que oscilan entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso.

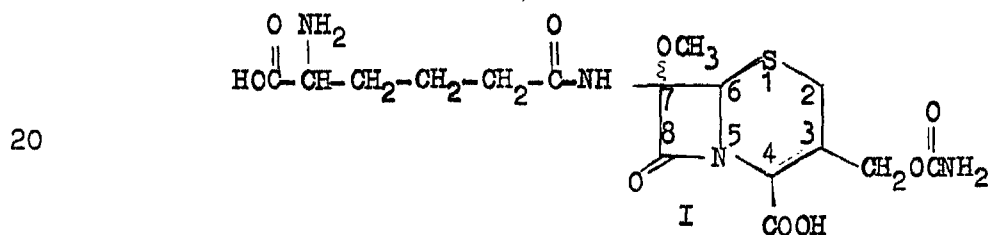
25 La fermentación se realiza a temperaturas comprendidas entre 20°C y 37°C; sin embargo, para obtener los resultados  
óptimos, es preferible efectuar la fermentación a temperaturas de unos 24 a 32°C aproximadamente. El pH de los

402903 - 2



1 medios nutritivos adecuados para desarrollar los cultivos  
de Streptomyces y producir el antibiótico debe estar com-  
prendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

5 El ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-  
(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico de Fórmu-  
la I es producido durante la fermentación aerobia antes  
descrita por una variedad de Streptomyces lactamdurans y  
de Streptomyces clavuligerus, capaz de producir dicho com-  
puesto como, por ejemplo, las variedades que se encuentran  
10 en depósito permanente sin restricciones en la colección de  
cultivos del Northern Utilization Research and Development  
Branch del Departamento de Agricultura de Estados Unidos en  
Peoria, Illinois, bajo los números de accesión NRRL 3802 y  
NRRL 3585, respectivamente. También pueden utilizarse otras  
15 variedades de estas especies, como los mutantes obtenidos  
por agentes de mutación o aislados de la naturaleza.



25 Este compuesto es anfótero, con un punto isoelectrónico  
aparente a pH 3,5 aproximadamente y es estable en so-  
lución dentro de un intervalo de pH de 1,5 a 9,0 aproxima-  
damente. ;

402903



1 El compuesto antibiótico de Fórmula I anterior  
y sus sales presentan resistencia no solo a la penicilina-  
sa sino también a las cefalosporinas. Este compuesto es  
activo en la inhibición del crecimiento de los microorganismos  
5 Gram-positivos y Gram-negativos y presentan una mayor  
actividad contra los microorganismos Gram-negativos. A dife-  
rencia de la cefalosporina C que tiene una actividad antibac-  
teriana relativamente baja, los productos de esta invención  
presentan un importante efecto Gram-negativo in vivo con una  
10 potencia que, en general, es mayor que la de la cefalotina.  
Esta actividad comprende la eficacia in vivo sobre Proteus  
morganii y, además, la eficacia contra las siguientes bacte-  
rias Gram-negativas: Escherichia coli, Proteus vulgaris,  
Proteus mirabilis, Salmonella schottmuelleri, Klebsiella  
15 pneumoniae AD, Klebsiella pneumoniae B y Paracolobactrum  
arizonae.

Los bioensayos para este antibiótico se realizan  
mediante un procedimiento de disco-placa utilizando discos  
de papel de filtro de 3/8" (9,5 mm). Las placas de ensayo  
20 se preparan utilizando ágar nutritivo Difco más 2,0 g/litro  
de extracto de levadura Difco, a razón de 10 ml por placa.  
Un cultivo de una noche del organismo de ensayo, Vibrio  
percolans ATCC 8461 se diluye en solución salina estéril  
hasta formar una suspensión con una transmitancia del 40 %  
25 a una longitud de onda de 660 mμ. Esta suspensión se agrega

402903



1 a razón de 20 ml/litro de medio antes de verterla en las  
placas.

5 Las placas de ensayo se mantienen a 4°C hasta que  
se utilizan (5 días como máximo). Después de la aplicación  
de los discos de ensayo saturados de antibiótico, las pla-  
cas se incuban a 28°C durante un período de 8 a 24 horas.  
Las zonas de inhibición se leen como milímetros de diáme-  
tro. Se utilizan para determinar las potencias relativas o,  
cuando se comparan con un patrón de referencia purificado,  
10 la potencia en  $\mu\text{g/ml}$ .

15 Debido a la dificultad inherente a la separación  
de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carbamiloxi-  
metil)-7-metoxi-3-cefa-4-carboxílico de las grandes canti-  
dades de impurezas contenidas en el caldo de fermentación, es  
de gran importancia encontrar una forma de aumentar la concen-  
tración del antibiótico respecto a los sólidos totales del  
caldo.

20 Por lo tanto, un objeto de esta invención es pro-  
porcionar un método para aumentar el rendimiento de antibió-  
tico en un proceso de fermentación. Otro objeto de la inven-  
ción es proporcionar un método de aumentar el rendimiento de  
un antibiótico empleando en el proceso de fermentación aditi-  
vos químicos relativamente baratos y fácilmente asequibles.  
25 Otros objetos de la invención se pondrán en evidencia más  
adelante.

402903



1                    Se ha descubierto que la adición de tiosulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), ditionito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), ácido  $\alpha$ -amino-  
adípico o la adición combinada de tiosulfato sódico y ácido  $\alpha$ -aminoadípico a los medios de fermentación orgánicos  
5                    complejos y químicamente definidos favorece la producción de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico.

10                    Por medios "orgánicos complejos" se entiende los medios en los que algunos de los ingredientes no están químicamente definidos. Un ejemplo de estos medios es el constituido por avena de la marca Crescent, harina de soja, citrato sódico, un antiespumante y solubles de destilería.  
15                    Por medios "químicamente definidos" o "sintéticos" se entienden los medios en los que todos los ingredientes están químicamente definidos. Un ejemplo de estos medios es el constituido por almidón de maíz, fosfato ácido potásico, citrato sódico, asparaguina, metionina, glutamato monosódico, cloruro cálcico, sulfato magnésico y sulfato férrico.

20                    La cantidad de tiosulfato sódico y/o ácido  $\alpha$ -aminoadípico o ditionito sódico necesaria para estimular la producción del antibiótico depende del cultivo y del medio empleado. En el caso del cultivo de Streptomyces lactamdurens se observa un aumento en la producción del antibiótico en  
25                    medios sintéticos que contienen de 0,005 a 1,6 % (en peso/volumen) de cualquiera de estos aditivos. Sin embargo,

402903 -2



1 se prefiere emplear alrededor de 0,1 a 0,8 % con objeto de  
obtener una buena producción de antibiótico. Se obtienen  
rendimientos óptimos a un nivel de 0,3-0,5 %, con rendi-  
mientos especialmente buenos a 0,4 %. La adición de ditioni-  
5 to sódico o tiosulfato sódico a un medio sintético o quími-  
camente definido con Streptomyces lactandurans aumentará la  
producción de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(car-  
bamcilloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico hasta un 91-  
105 %, cuando el tiosulfato sódico se encuentra a una con-  
10 centración del 0,4 %. Con concentraciones superiores a  
1,6 % de tiosulfato sódico o de ditionito sódico se observa  
una tendencia a disminuir la producción del antibiótico en  
el medio.

15 Correspondientemente, en un medio nutritivo orgá-  
nico complejo empleando Streptomyces lactandurans, los ren-  
dimientos óptimos de antibiótico se observan a un nivel de  
0,05-0,1 % de tiosulfato sódico o de ditionito sódico.

20 También hemos encontrado que la combinación de tío-  
sulfato sódico y ácido DL- $\alpha$ -aminoadípico con Streptomyces  
lactandurans estimula la producción del antibiótico en me-  
dios sintéticos y complejos. La cantidad de tiosulfato só-  
dico es la descrita anteriormente, agregándose el ácido DL- $\alpha$ -  
aminoadípico en proporciones que oscilan entre 0,005 y 0,15 %  
(en peso/volumen). Preferiblemente, el ácido DL- $\alpha$ -aminoadí-  
25 pico se agrega en una proporción del 0,01 % aproximadamente

402903



1 (en peso/volumen), siendo los niveles óptimos combinados  
de tiosulfato sódico y ácido DL- $\alpha$ -aminoadípico alrededor de  
0,4 % y 0,01 %, respectivamente. El aumento de rendimiento  
es más notable en el medio sintético, aunque en el medio  
5 orgánico complejo también aumentan los rendimientos sobre  
los correspondientes a las fermentaciones de control.

Sorprendentemente, cuando el cultivo empleado es  
Streptomyces lactamdurans, el tiempo de adición de los adi-  
tivos estimulantes del rendimiento al caldo de fermentación  
es crítico. Así, si la adición de tiosulfato sódico y/o áci-  
10 do DL- $\alpha$ -aminoadípico o ditronito sódico tiene lugar 24-48 horas después de la  
inoculación, se obtienen rendimientos óptimos. Sin embargo,  
si la adición tiene lugar antes en el proceso de fermenta-  
ción, no se observa ningún aumento del rendimiento o se ob-  
15 serva un efecto inhibitorio.

Por el contrario, cuando el cultivo empleado es  
Streptomyces clavuligerus y el aditivo es tiosulfato sódico,  
ni el tiempo de adición ni la concentración de dicho aditivo  
son críticos. En general, el tiosulfato sódico estimula la  
20 producción de antibiótico en un promedio de alrededor del  
40 %, independientemente de si el aditivo se introduce al  
principio de la fermentación o después de la inoculación.  
Sin embargo, se han obtenido rendimientos especialmente bue-  
nos de antibiótico con este aditivo a concentraciones del  
25 orden de 0,20 % a 0,60 % (en peso/volumen).

402903



1                    Cuando se utiliza ditonito sódico y el cultivo  
es Streptomyces clavuligerus, el tiempo de adición es crí-  
tico. El ditonito estimula la síntesis de antibiótico  
cuando las adiciones se realizan varias horas después de  
5                    la inoculación, habitualmente de 24 a 31 horas después de  
la inoculación, pero el crecimiento del organismo es inhi-  
bido cuando el compuesto se agrega al principio de la fer-  
mentación. En general, puede utilizarse de 0,005 % a  
0,075 % (en peso/volumen) de ditonito con buenos resulta-  
10                    dos pero se obtienen rendimientos especialmente altos de  
antibiótico cuando este compuesto se agrega al medio de  
producción dentro de las 24-31 horas después de la inocula-  
ción a concentraciones comprendidas entre 0,025 % y 0,050 %  
aproximadamente.

15                    Asimismo, cuando se utiliza Streptomyces  
clavuligerus, la adición combinada de alrededor de 0,005 a  
0,6 % de tiosulfato y de 0,01 a 0,4 % de ácido L- $\alpha$ -aminoadípico  
generalmente estimula la producción de antibiótico has-  
20                    ta un grado incluso mayor que con el tiosulfato solo. En es-  
te aspecto, se ha encontrado que es especialmente adecuada  
una concentración de 0,20 % de tiosulfato sódico y 0,05 %  
de ácido L- $\alpha$ -aminoadípico (en peso/volumen) para estimular  
la producción de antibiótico cuando se añaden al principio  
25                    del proceso de fermentación.

                    Cuando se utiliza ácido L- $\alpha$ -aminoadípico por sí

402903



1 solo con el cultivo de Streptomyces clavuligerus, se ha en-  
contrado que alrededor de 0,01 % a 0,4 % (en peso/volumen)  
del aditivo estimula la producción de antibiótico. Sin embar-  
go, el intervalo preferido de 0,025 % a 0,05 % aproximadamen-  
5 te produce rendimientos especialmente buenos.

Los medios a los que se añaden los compuestos tio-  
sulfato, ditionito y ácido  $\alpha$ -aminoadípico pueden ser cual-  
quier medio nutritivo acuoso adecuado; sin embargo, cuando se  
utilizan ciertos medios en combinación con estos aditivos se  
10 obtienen cantidades especialmente altas del antibiótico. Así,  
sorprendentemente, se ha encontrado que el cultivo de  
Streptomyces clavuligerus da el rendimiento máximo en el si-  
guiente medio:

MEDIO I

15	Almidón	4,8 %
	Solubles de destilería	0,5 %
	Salvado de semilla de soja	0,21 %
	Glicerol	0,8 %
20	Caseína hidrolizada (N-Z Amina, tipo A)	0,5 %
	Heptahidrato de sulfato ferroso	0,01 %
	Agua corriente	1,0 litros

mientras que el cultivo de Streptomyces lactamdurans propor-

25 <sup>2</sup> N-Z Amina, tipo A: digesta enzimática de caseína; producto  
de la Sheffield Chemical Co., Norwich, New York.

402903



1 ciona rendimientos especialmente buenos de antibiótico en  
el Medio II siguiente:

MEDIO II

	Solubles de destilería	3,0 %
5	Levadura seca primaria	1,0 %
	Antiespumante Mobil par-S	0,25 %
	Glicina	0,05 %
	L-fenilalanina	0,30 %
	Almidón de maiz	2,0 %
10	Agua desionizada	1,0 litros

La discusión anterior está dirigida fundamentalmen-  
te a las fermentaciones que utilizan una variedad particular  
de los cultivos Streptomyces lactamdurans y Streptomyces  
clavuligerus. Sin embargo, también pueden utilizarse otras  
15 variedades de estos organismos, como los mutantes, para pro-  
ducir el antibiótico y debe resultar evidente para el exper-  
to en la técnica que el tiosulfato sódico, el ditionito sódico  
o la combinación de tiosulfato sódico y ácido DL- e L- $\alpha$ -  
aminoadípico puede ser usada para aumentar el rendimiento de  
20 antibiótico cuando se agregan a los caldos de fermentación  
que contienen estas variedades. Siguiendo las enseñanzas de  
esta invención, pueden introducirse cambios o modificaciones  
evidentes en los niveles óptimos del aditivo o en el momento  
de adición al medio de fermentación, etc, todo ello dentro  
25 del alcance del experto, sin importar que variedad de Streptomyces

402903



1974

1 lactamdurans o de Streptomyces clavuligerus se utiliza para  
producir el antibiótico ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalera-  
mido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico.

5 Aunque el nuevo antibiótico de esta invención es  
producido en cultivos superficiales y sumergidos, actualmen-  
te se prefiere realizar la fermentación en estado sumergido.  
Las fermentaciones a pequeña escala se realizan conveniente-  
mente colocando cantidades adecuadas de medio nutritivo en  
matraces, esterilizando los matraces y su contenido calentán-  
10 dolos a 120°C, inoculando los matraces con las esporas o con  
un cultivo celular vegetativo de una variedad de Streptomyces  
productora de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(car-  
bamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico, tapar sin  
apretar el cuello de los matraces con un algodón y permitien-  
15 do que la fermentación transcurra a temperatura constante de  
unos 28°C en un sacudidor, durante 3-5 días. Para el trabajo  
a mayor escala, es preferible efectuar la fermentación en tan-  
ques adecuados provistos de un agitador y de un medio para  
a20 airear el medio de fermentación. En este método, el medio nu-  
tritivo es preparado en el tanque y esterilizado por calenta-  
miento a 120°C. Después de enfriar, el medio esterilizado es  
inoculado con una fuente adecuada de cultivo celular vegetati-  
vo del cultivo de Streptomyces y la fermentación se deja trans-  
currir durante 2 a 4 días mientras se agita y/o airea el medio  
25 nutritivo y se mantiene una temperatura de unos 28°C. Este mé

402903



1 todo de producción de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-  
3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico es espe-  
cialmente adecuado para la preparación de grandes cantidades  
de este nuevo antibiótico.

5 La fermentación utilizando el microorganismo pro-  
ductor de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carba-  
moiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico puede ser lleva-  
da a cabo a temperaturas comprendidas entre 20° y 37°C apro-  
ximadamente. Sin embargo, para obtener resultados óptimos, lo  
10 más conveniente es efectuar la fermentación a temperaturas de  
26° a 30°C. El pH de los medios nutritivos adecuados para cul-  
tivar el Streptomyces y producir el antibiótico puede variar  
entre 5 y 9 aproximadamente. Sin embargo, el intervalo de pH  
preferido es de 6,0 a 7,5 aproximadamente.

15 En la puesta en práctica de la invención, se prepara  
una suspensión celular por adición de medio estéril a un  
cultivo inclinado de ágar del microorganismo productor de áci-  
do 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carbamoiloxime-  
til)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. Después se usa un crecimiento  
20 del cultivo inclinado para inocular un matraz de siembra y  
este último se agita a unos 28°C durante 1 a 3 días con obje-  
to de obtener un buen desarrollo. El matraz de siembra se uti-  
liza después para inocular los matraces de producción. Alter-  
nativamente, el matraz de siembra puede ser inoculado con un  
25 cultivo liofilizado o con un inóculum congelado.

402903



1974

1                    Generalmente la inoculación se lleva a cabo uti-  
lizando alrededor de 1 ml per cada 40 ml de medio de produc-  
ción. Después se agrega la concentración deseada de aditivo  
a los matraces de producción una vez transcurrido el tiempo  
5 de espera necesario y se deja que transcurra la fermenta-  
ción durante 2 a 4 días mientras se agita y/o airea el medio  
nutritivo y se mantiene la temperatura alrededor de 28°C.  
Todos los matraces de producción, es decir los que contienen  
aditivos y los matraces empleados como controles, son anali-  
zados después, generalmente al cabo de 96 horas, para deter-  
10 minar la cantidad de antibiótico producida en cada matraz.

El antibiótico ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalera-  
mido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico es  
convenientemente analizado mediante un procedimiento de disco-  
15 placa utilizando Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de  
ensayo. Se utilizan unos discos con un diámetro de 3/8"  
(9,5 mm). La actividad del antibiótico se expresa como micro-  
gramos por mililitro del ácido libre. Se prepara una curva  
patrón a partir de soluciones del antibiótico de concentra-  
20 ción conocida.

Los matraces de producción se analizan después dilu-  
yendo la muestra en solución reguladora de fosfato 0,02 M a  
pH 7 hasta una concentración apropiada. El organismo de ensa-  
yo es Vibrio percolans ATCC 8461 y el medio de ensayo es ágar  
25 nutritivo Difco más 0,2 % de extracto de levadura Difco. Los

402903



1 discos se sumergen en una solución de antibiótico patrón a  
una concentración de 5 µg/ml y se colocan sobre la placa en  
posición alterna respecto a la muestra. Después se incuban  
las placas a 37°C durante 18 horas y se determinan los diá-  
5 metros de las zonas en milímetros. Se emplean cinco placas  
de control conteniendo 4 niveles del patrón comprendidos en-  
tre 2,5 µg/ml y 20 µg/ml. El análisis se calcula mediante un  
nomograma y los resultados se registran como microgramos por  
10 mililitro de ácido libre.

10 El antibiótico puede ser recuperado del medio de  
fermentación por diversos procedimientos. El caldo filtrado  
puede ser pasado a través de una o más columnas cambiadoras  
de ión. La naturaleza anfótera del antibiótico permite la  
15 selección de resinas cambiadoras de ión catiónicas y anióni-  
cas para una recuperación máxima. El antibiótico adsorbido  
puede ser separado después por elución, preferiblemente en  
un disolvente volátil como piridina, que puede ser fácilmen-  
te eliminado.

20 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustra-  
tivos y no con fines limitativos.

#### EJEMPLO 1

25 En un cultivo de agar inclinado de Streptomyces  
lactamdurans NRRL 3802 se introducen 10 ml de leche descrema-  
da estéril. La suspensión de leche descremada es liofilizada  
en tubos estériles individuales que contienen 0,1-0,2 ml de



1 la suspensión y el cultivo liofilizado se emplea para inocu-  
lar un Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques, conteniendo  
40 ml de un medio de siembra que contiene 1 % de levadura pri-  
maria en agua destilada.

5 El matraz de siembra es incubado a 28°C durante  
2 días en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un recorri-  
do de 2" (5 cm). Para la segunda etapa de siembra se añaden  
1,0 ml del cultivo anterior a un medio sintético de la misma  
composición que el medio de producción sintético y se incuba  
10 como antes durante 2 días.

A cada uno de ocho Erlenmeyer de 250 ml conteniendo  
40 ml de medio estéril de la siguiente composición:

Medio de producción sintético

15	Glucosa	1,0 %
	Glutamato monosódico	0,425 %
	Fosfato potásico dibásico	0,2 %
	Cloruro amónico	0,1 %
	NaCl	0,05 %
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 %
20	CaCO <sub>3</sub>	0,025 %
	i-Inositol	0,02 %
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0025 %
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001 %
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0005 %
25	Acido para-aminobenzoico	0,000001 %

402903



1 en el volumen necesario de agua, a pH 7,0, se añaden 1,0 ml  
de la segunda fase de siembra preparada en la forma antes  
descrita. Al cabo de 30 horas de incubación se prepara una  
solución acuosa que contiene  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (ditionito sódico) o  
5  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (tiosulfato sódico) suficiente para dar una concen-  
tración final de 0,1 % y esta solución se distribuye en ca-  
da uno de seis matraces. Después se deja que transcurra la  
incubación durante 66 horas más a  $28^\circ\text{C}$  en un sacudidor rota-  
torio que opera a 220 rpm, con un recorrido de 2" (5 cm). El  
10 contenido de cada matraz se centrifuga a 8500 rpm durante  
3 minutos y el caldo se separa de los sólidos por decanta-  
ción. Los caldos que sobrenadan se analizan utilizando Vibrio  
percolans como organismo de ensayo. Los análisis de los caldos  
se encuentran a continuación:

15	<u>Experimento</u>	<u>Matraz</u>	<u>Aditivo</u>	<u>Producción de ácido Libre, <math>\mu\text{g/ml}</math></u>
	1	1 (control)	ninguno	36
		2	0,1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	56
		3	0,1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	50
20	2	1 (control)	ninguno	40
		2	0,1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	54
		3	0,1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	56

EJEMPLO 2

25 En unos matraces que contienen el medio y la siembra  
de microorganismo, preparados como en el Ejemplo 1, se introdu-

402903



1 cen los siguientes porcentajes de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al cabo de 30 horas de incubación. Después de 66 horas más de incubación, se analiza el caldo en la forma antes descrita para dar los siguientes resultados:

5

<u>Matraz</u>	<u>Cantidad de <math>\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3</math></u>	<u>Producción de ácido libre, <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math></u>
1 (control)	ninguno	33
2	0,05 %	51
3	0,10 %	57
10 4	0,20 %	59
5	0,40 %	62
6	0,80 %	56
7	1,2 %	51
8	1,6 %	43

15

EJEMPLO 3

Se realiza la siguiente fermentación, utilizando los mismos procedimientos generales antes descritos pero variando el momento de adición del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  o la cantidad de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  añadida, para ilustrar las condiciones óptimas para una mayor producción.

20

25

402903 - 2 OCT 1974



1 Producción de ácido libre, µg/ml

Cantidad de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> añadido (%)

<u>Adiciones</u>	<u>Ninguno</u>	<u>0,05</u>	<u>0,10</u>	<u>0,2</u>	<u>0,4</u>	<u>0,8</u>
1. Ninguno (control) 39						
5 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> al cabo de						
2. 0 horas	34	0	0	0	0	0
3. 30 horas	70	74	70	84	73	
4. Ninguno (control) 28						
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> al cabo de						
10 5. 0 horas	12	0	0	0	0	0
6. 30 horas	49	45	49	54	45	

Tiempo de adición de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (horas)

	<u>Ninguno</u>	<u>24</u>	<u>30</u>	<u>48</u>	<u>54</u>	<u>72</u>
7. Ninguno (control) 43						
15 8. 0,4% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	33	74	71	46	44	
9. Ninguno (control) 52						
10. 0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10	60	80	79	47	

EJEMPLO 4

20 Se realiza la siguiente fermentación para ilustrar las ventajas de utilizar la combinación de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y ácido DL- $\alpha$ -aminoadípico (AAA) como adición al medio de fermentación antes descrito.

25



	<u>Experimento</u>	<u>Matriz</u>	<u>Adiciones a las 30 horas</u>	<u>Producción de ácido libre, µg/ml</u>
1	1	1	Ninguno (control)	43
		2	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	74
5		3	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0,01 % AAA	120
	2	1	Ninguno (control)	33
		2	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	50
10		3	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0,01 % AAA	82
	3	1	Ninguno (control)	30
		2	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	57
		3	0,1 % AAA	32
15		4	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0,01 % AAA	65
	4	1	Ninguno (control)	35
		2	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	58
		3	0,01 % AAA	35
20		4	0,4 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0,01 % AAA	84

EJEMPLO 5

Los siguientes estudios se realizaron con un medio orgánico complejo como medio de fermentación. El medio de siembra se prepara en la forma descrita en el Ejemplo 1. Un

40290



1 inóculum al 2,5 % de la primera fase de siembra fué agregado al matraz en segunda fase de siembra conteniendo 2 % de autolizado de levadura Fleischman S-150, pH 7,0.

5 Después de 48 horas de incubación en la segunda fase de siembra, se utiliza 1 ml para inocular cada matraz conteniendo 40 ml del medio orgánico complejo. Este medio tiene la siguiente composición:

Medio orgánico complejo

	Levadura seca primaria	10 g
10	Solubles de destilería	30 g
	Glicina	0,5 g
	L-fenilalanina	3 g
	Almidón de maiz	20 g
	Antiespumante Mobil par-S	2,5 ml
15	Agua destilada	1000 ml
	El pH se ajusta a 7,5	

Se realizan las adiciones al medio en las cantidades indicadas. El tiempo total de fermentación es de 96 horas y el análisis se realiza en la forma antes descrita.

20 Los resultados son los siguientes:

25

402903



1974

1

Producción de 842A,  $\mu\text{g/ml}$ 

Tiempo de adición (horas)

Matraz	Adiciones	Tiempo de adición (horas)				
		Ninguna	0	24	48	72
1	Control	183				
2	0,005 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		180	233	171	175
3	0,01 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		208	230	222	191
4	0,05 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		226	256	241	173
5						
6	0,10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		217	-	241	184

10

EJEMPLO 6

Adición de tiosulfato sódico; procedimiento de fermentación modificado

Etapa A: Tubos inclinados

15

Un tubo liofilizado de cultivo de Streptomyces clavuligerus (NRRL 3585) se abre asépticamente y el organismo se transfiere a tubos inclinados de ágar de la siguiente com posición:

20

Dextrina	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Caseína hidrolizada (N-Z Amina, tipo A)	2,0 g
Extracto de buey	1,0 g
Agar	20,0 g
Agua desionizada	1,0 litros

25

402903



1 El pH de este medio se ajusta a 7,0 mediante adición de hidróxido sódico. Después los tubos inclinados se incuban durante 7 días a 28°C y se conservan en frío.

Etapa B: Sistema de siembra

5 El cultivo inclinado de la Etapa A se utiliza para inocular 100 ml de un medio de siembra de la siguiente composición:

	Glucosa	15,0 g
	Harina de semilla de soja	15,0 g
10	Sólidos del licor de infusión de maíz	5,0 g
	Carbonato cálcico	2,0 g
	Cloruro sódico	5,0 g
	Agua desionizada	1,0 litros

15 Este medio se ajusta a pH 6,7 por adición de hidróxido sódico. El medio de siembra se incuba después a 28°C y se sacude en un sacudidor giratorio con un recorrido de 2" (5 cm), a 220 rpm, durante 48 horas.

Etapa C: Producción de antibiótico

20 Se utiliza un inóculum (1,0 ml) de la fase de siembra para inocular 40 ml de medio de producción en Erlenmeyer de 250 ml. Este medio tiene la siguiente composición:

25

402903



- 2-011-074

1

Medio I

Almidón	4,8 %
Solubles de destilería	0,5 %
Salvado de semilla de soja	2,1 %
5 Glicerol	0,8 %
Caseína hidrolizada (N-Z Amina, tipo A)	0,5 %
Heptahidrato de sulfato ferroso	0,01 %
Agua corriente	1,0 litros

10

Esta solución se ajusta a pH 6,5 con hidróxido sódico, se dispensa en Erlenmeyer de 250 ml y se esteriliza calentándola durante 15-20 minutos a 120°C y 15 psi (1,05 kg/cm<sup>2</sup>). La incubación se realiza durante 4 días a 28°C en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un recorrido de 2" (5 cm).

15

Cuando la fermentación es completa, las células se separan por centrifugación y el caldo se diluye con solución reguladora de fosfato, a pH 7,0. La concentración de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico en el caldo de fermentación se determina por el método de ensayo biológico normalizado de disco.

20

El organismo de ensayo empleado es Vibrio percolans (ATCC-8461). Se sumergen unos discos de papel de filtro en los caldos diluídos y se colocan sobre la superficie de placas Petri conteniendo ágar, que han sido inoculadas con el organismo de ensayo Vibrio percolans (ATCC 8461). También se colocan sobre estas placas Petri los discos que han sido sumergidos previa-

25

402903



OCT. 1974

1 mente en soluciones patrón que contienen concentraciones co  
nocidas del antibiótico. Los discos se incuban durante la no  
che a 28°C y se registran los diámetros de las zonas de inhi  
bición. La concentración de antibiótico en el caldo fermenta  
5 do se calcula por interpolación a partir de la curva patrón  
que relaciona el diámetro de la zona con las concentraciones  
conocidas de las soluciones patrón de antibiótico. Por este  
procedimiento se calcula que el Streptomyces clavuligerus  
NRRL 3583 produce un promedio de 749 µg/ml de ácido 7-(D-5-  
10 amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-  
cefem-4-carboxílico en el medio de producción basal.

Etapa D: Adición de tiosulfato sódico

La adición de tiosulfato sódico al Medio I en la  
Etapa C, supra, aumenta considerablemente el rendimiento de  
15 ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloxime-  
til)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. La siguiente Tabla I  
indica el grado de este aumento en una gama de concentra-  
ciones. El control se realiza en la forma descrita en las  
Etapas A-C anteriores y las experiencias restantes se llevan  
20 a cabo de forma idéntica pero con adición de las cantidades  
indicadas de tiosulfato sódico, durante un periodo compendi-  
do entre 0 y 48 horas. Por hora "cero" entendemos que el tie-  
sulfato sódico se añade aproximadamente en el momento de la  
inoculación con la semilla de la Etapa B. Los ensayos se rea-  
25 lizaron en la misma forma que en la Etapa C.

402903



OCT. 1974

1

TABLA I

<u>Experimento</u>	<u>Matraz</u>	<u>Tiempo de adición</u>	<u>Tiosulfato añadido</u>	<u>Producción de antibió- tico (µg/ml)</u>
	1	Control	Nada	721
5	2	0 horas	0,10 %	865
	3	24 horas	0,10 %	828
	1	Control	Nada	755
	2	0 horas	0,10 %	991
10	3	0 horas	0,20 %	1153
	4	0 horas	0,40 %	856
	5	40 horas	0,10 %	1120
	6	48 horas	0,10 %	1095
	1	Control	Nada	748
15	2	0 horas	0,10 %	936
	3	0 horas	0,20 %	845
	4	0 horas	0,40 %	1023
	1	Control	Nada	658
20	2	0 horas	0,10 %	945
	3	0 horas	0,20 %	1154
	4	0 horas	0,40 %	1150
	5	0 horas	0,60 %	1162
	1	Control	Nada	891
25	2	0 horas	0,10 %	1211

402903



TABLA I (continuación)

1

<u>Experimento</u>	<u>Matraz</u>	<u>Tiempo de adición</u>	<u>Tiosulfato añadido</u>	<u>Producción de antibiótico (µg/ml)</u>
5	3	0 horas	0,20 %	1291
5	4	0 horas	0,40 %	1133
6	1	Control	nada	766
	2	0 horas	0,20 %	995

10 Los resultados de la Tabla I indican que la adición de tiosulfato sódico estimula la producción de antibiótico en un promedio del 40 % en 6 experimentos. Ni el tiempo de adición ni la concentración de tiosulfato son críticos al parecer.

EJEMPLO 7

Adición de tiosulfato sódico y/o ácido L-α-aminoadípico

15

En este experimento se repite el procedimiento del Ejemplo 6, a excepción de que en lugar de las concentraciones de tiosulfato sódico allí citadas se emplean las siguientes concentraciones de ácido L-α-aminoadípico solo y tiosulfato sódico en combinación con L-AAA. Las adiciones se realizan al inóculum del Ejemplo 6, Etapa C, antes de la incubación.

20

25

402903



1

TABLA II

<u>Matraz nº</u>	<u>% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y L-AAA</u>	<u>Producción de anti biótico (ug/ml)</u>
1	Nada (control)	766
5 2	0,025 % L-AAA	833
3	0,050 % L-AAA	880
4	0,20 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	995
5	0,20 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0,025 % L-AAA	1051
6	0,20 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0,05 % L-AAA	1195

10

Estos resultados indican que la adición combinada de tiosulfato sódico y ácido L- $\alpha$ -aminoadípico (L-AAA) estimula la producción del antibiótico ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefer-4-carboxílico en mayor grado que el tiosulfato sódico solo.

15

La adición de una mezcla de 0,20 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y 0,05 % de ácido L- $\alpha$ -aminoadípico fué considerada la más eficaz para aumentar el rendimiento de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefer-4-carboxílico.

EJEMPLO 8

20

Adición de ditionito sódico

Se repite el procedimiento del Ejemplo 6 a excepción de que se emplea ditionito sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) en lugar de tiosulfato sódico en la Etapa D. La siguiente tabla indica las concentraciones a las cuales se emplea el ditionito sódico y el aumento de rendimiento del antibiótico atribuido al mismo.

25

402903



1

TABLA III

<u>% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub></u>	<u>Tiempo de adición (horas)</u>	<u>Producción de antibiótico. (µg/ml)</u>
Nada (control)	0	703
0,025	0	0
0,050	0	0
0,025	24	835
0,050	24	763
0,025	31	793
0,050	31	738

5

10

Estos resultado indican que el ditionito sódico estimula la síntesis de antibiótico cuando las adiciones se realizan de 24 a 31 horas después de la inoculación; sin embargo - cuando el compuesto se agrega al principio de la fermentación el crecimiento del organismo es inhibido.

15

Habiendo descrito la invención, se considera como una novedad, y por lo tanto, declaramos como de nuestra propiedad lo contenido en las siguientes:

#### REIVINDICACIONES

20

1. Mejoras introducidas en un procedimiento de preparación de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico por cultivo de un nuevo actinomicete en un medio nutritivo, caracterizadas las mejoras porque consisten en añadir al medio nutritivo, solos o en combinación, tiosulfato sódico, ditionito sódico o ácido α-ami

25

*Roy*

402903



1974

1

noadípico.

2. Mejoras según la reivindicación 1, en las que el actinomicetes es una nueva variedad de Streptomyces.

5

3. Mejoras según la reivindicación 2, en las que el actinomicetes es Streptomyces lactamdurans o Streptomyces clavuligerus.

10

4. Mejoras según la reivindicación 1, en las que el ditionito sódico o el tiosulfato sódico se agrega dentro de las 24-48 horas después de la inoculación con el cultivo de Streptomyces lactamdurans.

5. Mejoras según la reivindicación 4, en las que el aditivo es tiosulfato sódico.

15

6. Mejoras según la reivindicación 5, en las que se añade al medio ácido DL- $\alpha$ -aminoadípico además de tiosulfato sódico.

7. Mejoras según la reivindicación 6, en las que se añade ácido DL- $\alpha$ -aminoadípico en la proporción de 0,005 a 0,015 % aproximadamente (en peso/volumen).

20

8. Mejoras según la reivindicación 5 en las que se agrega al medio nutritivo tiosulfato sódico en una concentración de 0,005-0,1 % (en peso/volumen) dentro de las 24-48 - horas después de la inoculación con el cultivo de Streptomyces lactamdurans.

25

9. Mejoras según la reivindicación 1, en las que el actinomicetes es Streptomyces clavuligerus y se agregan tio-

Reg

402903



1 sulfato sódico, ditionito sódico, ácido  $\alpha$ -aminoadípico o una  
combinación de tiosulfato sódico y ácido  $\alpha$ -aminoadípico a -  
dicho medio nutritivo.

5 10. Mejoras según la reivindicación 9, en las que se  
añaden el tiosulfato sódico y el ácido L- $\alpha$ -aminoadípico al  
medio nutritivo aproximadamente en el momento de la inocula-  
ción con el cultivo de Streptomyces clavuligerus.

10 11. Mejoras según la reivindicación 9, en las que -  
la concentración de tiosulfato sódico es alrededor de 0,025%  
a 0,2 % y la concentración de ácido L- $\alpha$ -aminoadípico es al  
rededor de 0,1 % a 0,4 %.

12. Mejoras según la reivindicación 10, en las que se  
agrega 0,20 % de tiosulfato sódico y 0,05 % de ácido L- $\alpha$ -ami-  
noadípico al medio nutritivo antes de la inoculación.

15 13. Mejoras según la reivindicación 9, en las que -  
se añade de 0,005 a 0,4 % de ácido L- $\alpha$ -aminoadípico al me-  
dio nutritivo antes de la inoculación.

20 14. Mejoras según la reivindicación 9, en las que se  
añade alrededor de 0,005 % a 0,075 % de ditionito sódico, al  
medio nutritivo.

25 15. Se reivindica por último, como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE  
ACIDO 7-(D-5-AMINO-5-CARBOXIVALERAMIDO)-3-(CARBAMOILOXIMETIL)-  
7-METOXI-3-CEFEM-4-CARBOXILICO.

Rey

402903



1            Todo tal y como queda descrito y reivindicado en la  
presente Memoria descriptiva que consta de treinta y tres -  
páginas mecanografiadas.

Madrid, 18 de mayo de 1972

5

BERNARDO UNGRIA

P. E.

10

15

20

25

*Res*