



402904

Int. Cl.: C 12 D

Nº 402.904

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

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

Enunciado: MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL METODO DE PREPARACION DE ACIDO 7-(D-5-AMINO-5-CARBOXIVALERAMIDO)-3-(CARBAMOILOXIMETIL)-7-METOXI-3-CEFEM-4-CARBOXILICO.

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense nº 145.573 del 20 de mayo de 1.971.

POOR
QUALITY

402904

178 MAY 1972



1 Esta invención se refiere a un procedimiento de fer-
mentación mejorado para la producción del antibiótico áci-
do 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-
7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. En especial esta invención
5 se refiere a un método mejorado para la producción de dicho
antibiótico por fermentación de medios nutritivos con va-
riedades adecuadas de microorganismo Streptomyces lactamdu-
rans.

10 El cultivo de Streptomyces lactamdurans es una nueva
variedad de actinomicetes y una muestra de este microorga-
nismo, denominada MA-2908, ha sido colocada en la colección
de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey. Una
muestra de este cultivo ha sido también colocada en depó-
sito permanente con la colección de cultivos del Northern
15 Utilization Research and Development Branch del Departamen-
to de Agricultura de Estados Unidos en Peoria, Illinois. Es-
te cultivo ha recibido el número de cultivo NRRL 3802.

20 El ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(car-
bamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico (denominado
en adelante el "antibiótico") es producido durante la fer-
mentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados,
en condiciones controladas. Son adecuados los medios acuo-
sos como los empleados para la producción de otros antibió-
ticos. Estos medios contienen fuentes de carbono y nitróge-
no que son asimilables por el microorganismo y sales incor-
25



402904

1 gánicas. Además, los medios de fermentación contienen tra-
zas de metales necesarios para el desarrollo del microorga-
nismo que son comúnmente proporcionados como impurezas acci-
dentales de los otros constituyentes del medio. En general,
5 pueden utilizarse hidratos de carbono como azúcares, por
ejemplo sacarosa, maltosa, fructosa, lactosa y similares y
almidones como granos, por ejemplo avena y centeno, almidón
de maíz, harina de maíz y similares, sólo o en combinación
como fuentes de carbono asimilables en el medio nutritivo.
10 La cantidad exacta de fuente o fuentes de hidratos de car-
bono utilizadas en el medio dependerá en parte de los otros
ingredientes del medio. Sin embargo, se ha encontrado que
es suficiente una cantidad de hidrato de carbono compendi-
da entre 1 y 6 % en peso del medio, aproximadamente. Puede
15 utilizarse una sola fuente de carbono o varias fuentes com-
binadas en el medio.

Las fuentes de nitrógeno satisfactorias son miles
de materiales proteicos, tales como diversas formas de hi-
drolizados de caseína, harina de soja, licor de infusión
20 de maíz, solubles de destilería, productos de levadura, pas-
ta de tomate y similares. Las diversas fuentes de nitróge-
no pueden ser utilizadas sólo o en combinación y se em-
plean en cantidades que oscilan entre 0,2 y 6 % del peso
del medio acuoso.

25 La expresión "medios orgánicos complejos" en el sen-

402904

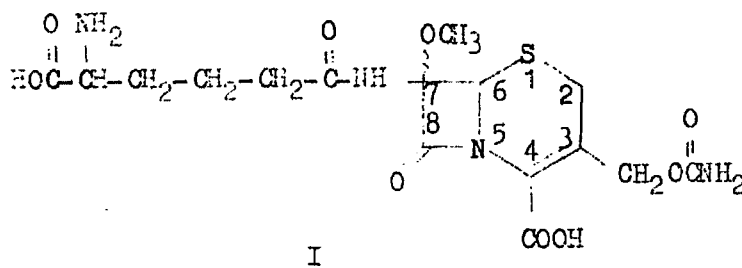
18 MAR 1976



1 tido utilizado en esta memoria se refiere a 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,
5 poliglicol y solubles de destilería.

La fermentación se lleva a cabo a temperaturas com-
prendidas entre 20°C y 37°C; sin embargo, para obtener re-
sultados óptimos se prefiere efectuar la fermentación a tem-
peraturas de 24 a 32°C aproximadamente. El pH de los medios
10 nutritivos adecuados para desarrollar el cultivo de Strepto-
myces lactamdurans y producir el antibiótico debe estar com-
prendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

El ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carba-
moiloximetil)-7-butoxi-3-cefem-4-carboxílico responde a la
15 siguiente fórmula plana:



20 Este compuesto (I) es producido durante la fermenta-
ción aerobia antes descrita de una variedad de Streptomyces
lactamdurans capaz de producir dicho compuesto como, por
ejemplo, la variedad que se encuentra en depósito permanente
25

402904



1 en el Northern Utilization Research and Development Branch
bajo la accesión nº NRRL 3802. También pueden utilizarse
otras variedades de esta especie, como los mutantes obteni-
dos por agentes de mutación o aislados de la naturaleza. El
5 antibiótico (I) es anfótero, con un punto isoelectrico apa-
rente a pH 3,5 aproximadamente y es estable en solución en
un intervalo de pH de 1,5 a 9,0 aproximadamente.

El antibiótico y sus sales presentan resistencia no
solamente a la penicilinaso sino también a las cefalospo-
10 rinasas y exhiben una actividad aumentada contra los micro-
organismos Gram-negativos. A diferencia de la cefalospori-
na C que presenta una actividad antibacteriana relativamen-
te baja, el antibiótico de esta invención y sus sales pre-
sentan un significativo efecto Gram-negativo in vivo con
15 una potencia que, en general, es mayor que la de la cefa-
lotina. Esta actividad comprende la eficacia in vivo sobre
Proteus morganii y, además, la eficacia contra las siguien-
tes bacterias Gram-negativas: Escherichia coli, Proteus
vulgaris, Proteus mirabilis, Salmonella schottmuelleri,
20 Klebsiella pneumoniae AD, Klebsiella pneumoniae B y
Paracolonobactrum arizoniae.

Los bioensayos de este antibiótico se realizan me-
diante un proceso en disco-placa utilizando discos de pa-
pel de filtro de 3/8" (9,5 mm). Las placas de ensayo se
25 preparan utilizando agar nutritivo Difco más 2,0 g/litro



18 MA

402904

1 de extracto de levadura Difco a razón de 10 ml por placa.
Un cultivo de una noche del organismo de ensayo, Vibrio
percolans MB-1272, es diluido en solución salina estéril
hasta una suspensión con una transmitancia del 40 % a una
5 longitud de onda de 660 m μ . Esta suspensión se agrega a ra-
zón de 20 ml/litro al medio antes de verterlo en las pla-
cas. El organismo Vibrio percolans se encuentra depositado
en la Culture Collection de la American Type Culture Co-
llection, donde puede obtenerse bajo la siguiente designa-
10 ción: Vibrio percolans MB-1272, ATCC 8461.

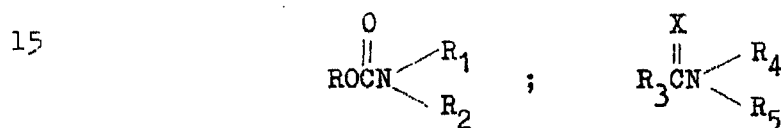
Las placas de ensayo se mantienen a 4°C hasta que
se utilizan (5 días como máximo). Después de la aplicación
de los discos de ensayo saturados con antibiótico, las pla-
cas son incubadas a 28°C durante un periodo de 8 a 24 horas.
15 Las zonas de inhibición se leen como mm de diámetro. Se
utilizan para determinar las potencias relativas o, cuando
se compara con un patrón de referencia purificado, la po-
tencia en $\mu\text{g/ml}$.

Debido a la dificultad inherente en la separación
20 del ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoil-
oximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico puro de las gran-
des cantidades de impurezas contenidas en el caldo de fer-
mentación, es de gran importancia encontrar una forma de
aumentar la concentración del antibiótico respecto a los
25 sólidos totales del caldo.



1 Por lo tanto, un objeto de esta invención es propor-
 cionar un método para aumentar el rendimiento del antibió-
 tico en un proceso de fermentación. Otro objeto de esta in-
 vención es proporcionar un método para aumentar el rendi-
 5 miento de antibiótico empleando aditivos químicos relativa-
 mente baratos y fácilmente asequibles en el proceso de fer-
 mentación. Otros objetos de la invención se pondrán en evi-
 dencia más adelante.

Ahora se ha descubierto que la adición de glicina,
 10 L-fenilalanina, un carbamato de Fórmula II, infra, o una
 amida de Fórmula III, infra, a los medios de fermentación
 orgánicos complejos y químicamente definidos aumenta la pro-
 ducción de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(car-
 bamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico:



II

III

donde R es alquilo, por ejemplo alquilo inferior, etilo,
 20 n-propilo o n-butilo y similares y R₁ y R₂ son iguales o
 diferentes y están seleccionados entre hidrógeno, alquilo,
 por ejemplo alquilo inferior como metilo, etilo, n-propilo
 o n-butilo y similares o hidroxialquilo inferior, por ejem-
 plo 2-hidroxietilo o 3-hidroxipropilo o similares; R₃ es
 25 hidrógeno, alquilo como metilo, etilo, n-propilo, n-butilo,

402904

18



1 n-pentilo o undecilo y similares, oxoalquilo inferior como
2-oxopropilo y similares o arilo, por ejemplo arilo de un
solo núcleo como fenilo; R_4 y R_5 son iguales o diferentes
y están seleccionados entre hidrógeno, alquilo, por ejem-
5 plo alquilo inferior como metilo, etilo, n-propilo, n-butilo,
isobutilo o n-pentilo y similares o hidroxialquilo infe-
rior como 2-hidroxi-etilo o 3-hidroxi-propilo y similares; y
X es oxígeno o azufre.

La cantidad de glicina, L-fenilalanina, carbamato
10 (II) o amida (III) necesaria para estimular la producción
del antibiótico varía con el medio empleado. En general,
se ha observado un aumento en la producción del antibióti-
co en los medios que contienen de 0,01 a 0,10 % (en peso/vol-
umen) de glicina y de 0,05 a 0,3 % (en peso/volumen) de
15 L-fenilalanina. Sin embargo, las concentraciones preferidas
son 0,05 % de glicina y 0,3 % de L-fenilalanina. Los carba-
motos (II) y las amidas (III) se emplean en las proporció-
nes de 0,0156-2,0 % aproximadamente y se han obtenido ren-
dimientos especialmente buenos con los N-2-hidroxialquil-
20 carbamatos, por ejemplo con alrededor de 0,2 a
0,8 % de N-2-hidroxi-etilcarbamato de etilo.

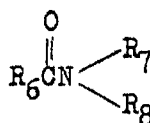
También hemos encontrado que la adición de una amida
de la siguiente fórmula al medio de fermentación produce
un aumento importante en el rendimiento del antibiótico:

25

402904



1



5

10

donde R_6 es hidrógeno o alquilo inferior como metilo o etilo y R_7 y R_8 son hidrógeno o alquilo inferior, especialmente isobutilo. El compuesto N,N-di-isobutilpropionamida es especialmente preferido y proporciona rendimientos superiores cuando se emplea a una concentración de 0,063-0,125 % del medio empleado. Las concentraciones de glicina superiores al 0,3 %, las concentraciones de L-fenilalanina superiores al 0,5 % y las concentraciones de carbamatos superiores al 0,8 % suelen reducir la producción del antibiótico.

15

20

25

Además de ser utilizados por sí solos, hemos encontrado que la glicina, la L-fenilalanina y un carbamato de Fórmula II, supra, y/o una amida de Fórmula III, supra, pueden ser combinados para formar un aditivo que induce un rendimiento especialmente bueno del antibiótico. Así, por ejemplo, la combinación de 0,05 % de glicina, 0,3 % de L-fenilalanina y una cantidad de carbamato (II) y/o de amida (III) comprendida entre 0,0156-2,0 % de concentración final es especialmente adecuada para estimular el rendimiento de antibiótico. Preferiblemente, en esta combinación, el carbamato es N-2-hidroxietilcarbamato de etilo a una concentración final de 0,2-0,8 % y la amida es N,N-di-isobutilpropionamida a una concentración final de 0,063-0,125 %.



18 MAR 1972

402904

1 La discusión anterior está dirigida fundamentalmen-
te a las fermentaciones que utilizan la variedad madre
Streptomyces lactamdurans. Sin embargo, también pueden uti-
lizarse otras variedades de este organismo, como los mutan-
5 tes, para producir el antibiótico. Resulta evidente para el
experto en la técnica que el carbamato (II) o la amida (III)
también pueden ser utilizados para aumentar el rendimiento
del antibiótico cuando se agregan a los lotes de fermenta-
ción. Siguiendo las enseñanzas de esta invención, modifica-
10 ciones o cambios evidentes en los niveles óptimos de aditi-
vo, tiempo de adición durante la fermentación, etc. están
al alcance de los expertos en la técnica, independientemente
de la variedad utilizada de Streptomyces lactamdurans
para producir el ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-
15 (carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico (I).

Aunque el antibiótico (I) de esta invención es pro-
ducido en cultivos superficiales y sumergidos, actualmente
se prefiere llevar a cabo la fermentación en estado sumergi-
do. Las fermentaciones a pequeña escala se efectúan conve-
20 nientemente colocando cantidades adecuadas de medio nutri-
tivo en matraces, esterilizando los matraces y su contenido
por calentamiento a 120°C, inoculando los matraces con es-
poras o un cultivo celular vegetativo de una variedad de
Streptomyces productora de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxi-
25 valerámico)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carbo-

402904

18



1 xílico, tapando sin apretar los cuellos de los matraces
con algodón y dejando que la fermentación transcurra a una
temperatura ambiente constante de unos 28°C en un sacudidor
durante 3 a 5 días. Para el trabajo a mayor escala, es pre-
5 ferible efectuar la fermentación en tanques adecuados pro-
vistos de un agitador y un medio de aireación del medio de
fermentación. En este método, el medio nutritivo se prepara
en el tanque y se esteriliza calentándolo a 120°C. Después
de enfriar, el medio esterilizado es inoculado con una fuen
10 te adecuada de cultivo celular vegetativo del Streptomyces
y la fermentación se deja transcurrir durante 2-4 días mien
tras se agita y/o airea el medio nutritivo, manteniendo la
temperatura a 28°C aproximadamente. Este método de produc-
ción de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carba-
15 moiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico es especial-
mente adecuado para la preparación de grandes cantidades
del nuevo antibiótico.

La fermentación utilizando el microorganismo pro-
ductor de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(car-
20 bamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico puede ser
llevado a cabo a temperaturas comprendidas entre 20° y
37°C aproximadamente. Sin embargo, para obtener resultados
óptimos lo mejor es efectuar las fermentaciones a tempera-
turas de 26-30°C. El pH de los medios nutritivos adecuados
25 para cultivar el Streptomyces y producir el antibiótico

402904



1 puede variar entre 5 a 9 aproximadamente. Sin embargo, el
intervalo de pH preferido es de 6,0 a 7,5 aproximadamente.

5 En la puesta en práctica de la invención, se prepara
una suspensión celular por adición de medio estéril a un
cultivo inclinado de agar de un microorganismo productor de
ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerámico)-3-(carbamoiloxime-
10 til)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. Después se utiliza el
desarrollo de un cultivo inclinado para inocular un matraz
de siembra y este último se agita a unos 28°C durante 1 a
3 días para obtener un buen cultivo. El matraz de siembra
se utiliza después para inocular los matraces de producción.
Alternativamente, el matraz de siembra puede ser inoculado
con un cultivo liofilizado o con un inoculum congelado.

15 La inoculación se realiza generalmente empleando al-
rededor de 1 ml por cada 40 ml de medio de producción. Des-
pués se agrega a los matraces de producción la concentración
deseada de aditivo y se deja que transcurra la fermentación
durante 2-4 días mientras se agita y/o airea el medio nu-
tritivo y se mantiene la temperatura en unos 28°C. Todos
20 los matraces de producción, es decir los que contienen adi-
tivos y los matraces utilizados como controles, se anali-
zan después, generalmente al cabo de 96 horas, para deter-
minar la cantidad de antibiótico producida en cada matraz.

25 El antibiótico ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalerami-
do)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico es

402904 18 fink



1 después convenientemente analizado mediante un procedimiento
de disco-placa utilizando Vibrio percolans MB-1272 (ATCC 8461)
como organismo de ensayo. Se utilizan discos de 3/8" de diá-
metro (9,5 mm). Se prepara una curva patrón a partir de con-
5 centraciones conocidas del antibiótico y la actividad se ex-
presa en microgramos, es decir, mg, por mililitro de ácido
libre.

Después se analizan los matraces de producción dilu-
yendo la muestra en solución reguladora de fosfato 0,02 M
10 a pH 7 hasta una concentración apropiada. El organismo de
ensayo es Vibrio percolans MB-1272 (ATCC 8461) y el medio
de ensayo empleado es agar nutritivo Difco más extracto de
levadura Difco al 0,2 %. Los discos se sumergen en 5 mg por
mililitro de la solución patrón de antibiótico y se colo-
15 can sobre la placa en una posición alternada respecto a la
muestra. Después las placas se incuban a 37°C durante 18 ho-
ras y se determinan los diámetros de las zonas en milíme-
tros. Se emplean 5 placas corrientes conteniendo cuatro
proporciones del patrón comprendidas entre 2,5 y 20 mg/ml.
20 El análisis se calcula mediante un nomograma y los resul-
tados se registran como microgramos/mililitro.

El antibiótico puede ser recuperado del medio de
fermentación por diversos procedimientos. El caldo fil-
trado puede ser pasado por una o más columnas cambiadoras
25 de ión. La naturaleza anfótera del antibiótico (I) permite

402904

18 hrs



1 la selección de resinas cambiadoras de ión catiónicas y
aniónicas para obtener una recuperación óptima. El anti-
biótico adsorbido puede ser separado después por elución,
preferiblemente en un disolvente volátil como la piridina
5 que pueda ser fácilmente eliminado.

El antibiótico ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivalera-
mido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico
(I) y sus sales son eficaces para inhibir el crecimiento de
varios microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos.

10 Los siguientes ejemplos se dan a título ilustrati-
vos y no limitativo de la invención.

EJEMPLO 1

Producción de antibiótico; adición de glicina

Proceso de fermentación modificado

15 Etapa A: Tubos inclinados

Un tubo liofilizado de cultivo de Streptomyces lactam
durans (MA-2908) se abre asépticamente y el organismo se
transfiere a un medio de la siguiente composición:

Medio I:

20 Melazas finales 1 %
Levadura de National Brewer 1 %
Agar Difco pH 7,0 2,5 %
Agua hasta el volumen deseado.

Los tubos inclinados se incuban durante 7 días a
25 28°C. Cuando se mantienen en frío, los tubos inclinados son

402904

18



1 estables durante más de 13 semanas.

Etapa B: Fases de siembra: Sistema en dos fases

5 Primera siembra: La primera siembra ha sido inoculada directamente del tubo inclinado de la Etapa A a 40 ml de levadura seca primaria al 1 % N.F., pH 7,0 (obtenida de la Yeast Product Corporation) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques. Después los matraces se agitan en un sacudidor rotatorio a 220 rpm con un recorrido de 2" (5 cm), a 28°C, durante un periodo de 2 a 3 días.

10 Segunda siembra: Un inoculum al 2,5 % procedente de la primera fase de siembra se añade a un matraz que contiene un autolizado de levadura al 2 % Fleischmann S-150, pH 7,0. El crecimiento de esta fase es característicamente ligero y la incubación, realizada como en la primera fase a 28°C, no se prolonga más de 48 horas.

15 Etapa C: Medio de producción basal

El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

Medio II:

20 Solubles de destilería	3,0 %
Levadura seca primaria	0,75 %
Antiespumante Mobil par-S	0,25 %

25 Este medio se ajusta a pH 7,0 con una pequeña cantidad de solución concentrada de hidróxido sódico, se dispensa en matraces Erlenmeyer y se trata en autoclave durante

402904

18 May



1 15 a 20 minutos a 121°C. Después de enfriado, el medio re-
cibe un inoculum del 2,5 % de la siembra de la segunda fa-
se obtenida en la Etapa B. La incubación se realiza durante
3 días a 28°C en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un
5 recorrido de 2" (5 cm).

Cuando la fermentación es completa, las células se
separan por centriugación y el caldo se diluye con regula-
dor de fosfato, pH 7,0. La concentración de ácido 7-(D-5-
amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-
10 3-cefem-4-carboxílico en el caldo de fermentación se deter-
mina por el método de ensayo biológico normalizado de disco.
El organismo de ensayo empleado es Vibrio percolans (ATCC
8461). Los discos de papel de filtro se sumergen en los cal-
dos diluídos y se colocan sobre la superficie de placas Pe-
15 tri conteniendo agar que han sido inoculadas con el orga-
nismo de ensayo Vibrio percolans (ATCC 8461). También se co-
locan sobre estas placas Petri los discos que han sido su-
mergidos previamente en soluciones valoradas que contienen
concentraciones conocidas de 842A. Los discos son incubados
20 durante la noche a 28°C registrándose los diámetros de las
zonas de inhibición. La concentración de 842A y del caldo
fermentado se calcula por interpolación a partir de la cur-
va patrón que relaciona el diámetro de la zona con las con-
centraciones conocidas de las soluciones valoradas de 842A.
25 Por este procedimiento se calcula que el Streptomyces

402904



1 lactamdurans MB-2908 produce un promedio de 80,4 $\mu\text{g/ml}$ de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico en el medio de producción basal.

5 Etapa D: Adición de glicina

La adición de glicina al Medio II en la Etapa C, supra, aumenta considerablemente el rendimiento de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. La siguiente Tabla I indica el grado de este aumento en una gama de concentraciones. Los datos de esta tabla representan tres series distintas de ensayos, en los que el control se realiza de la misma forma descrita en las Etapas A-C anteriores y en los que los experimentos restantes fueron realizados de forma idéntica pero con adición de la cantidad indicada de glicina. Los ensayos se realizaron de la misma forma que en la Etapa C.

TABLA I

Experi- mento	% de glicina añ ada al Medio II	Producción de an- tibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	% de aumento so bre el control
Control	-	77	-
20 1	0,01	84	10 %
2	0,10	97	26 %
Control	-	76	-
1	0,05	106	41 %
2	0,10	93	22 %
Control	-	88	-
1	0,075	113	28 %
25 2	0,100	113	28 %
3	0,125	98	11 %

402904



1 Basándose en lo que antecede, la adición de 0,05 %
de glicina al medio de producción es considerada la más
efectiva para aumentar el rendimiento de ácido 7-(D-5-ami-
no-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-
5 cefem-4-carboxílico.

EJEMPLO 2

Producción de antibiótico; adición de L-fenilalanina

Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 a excepción
de que en lugar del aditivo glicina en la Etapa D se emplean
10 diversas concentraciones de L-fenilalanina. La siguiente
tabla indica las concentraciones de uso de la L-fenilalani-
na y el aumento del rendimiento de Antibiótico (I) atribuí-
do a la misma .

TABLA II

<u>Experi- mento</u>	<u>% de L-fenilalanina añadida al Medio II</u>	<u>Producción de an- tibiótico ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>% de aumento sobre el control</u>
Control	-	76	-
1	0,05	82	8 %
2	0,1	77	1 %
3	0,3	90	34 %
20 Control	-	85	-
1	0,1	100	18 %

EJEMPLO 3

Producción de antibiótico; adición de L-fenilalanina y gli-
cina

25 Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 a excepción

402904

18 MAR



de que se agrega L-fenilalanina al medio de producción basal que contiene 0,05 % de glicina. Este medio, identificado más abajo como Medio III, tiene la siguiente composición:

Medio III:

Solubles de destilería	3,0 %
Levadura seca primaria N.F.	0,75 %
Antiespumante Mobil par-S	0,25 %
Glicina	0,05 %

La siguiente tabla indica las concentraciones de uso de L-fenilalanina y el aumento del rendimiento de Antibiótico (I) atribuido a la misma.

TABLA III

<u>Experi- mento</u>	<u>% de L-fenilalanina añadida al Medio III</u>	<u>Producción de an- tibiótico (µg/ml)</u>	<u>% de aumento sobre el control</u>
Control	-	101	-
1	0,1	124	23 %
Control	-	103	-
1	0,3	118	15 %
Control	-	110	-
1	0,3	121	10 %

EJEMPLO 4

Producción de antibiótico; adición de carbamato de etilo y glicina

Se repite el procedimiento del Ejemplo 3, a excepción de que se emplea carbamato de etilo en lugar de L-fenilalanina. El medio de producción empleado es el Medio III del



402904

1 Ejemplo 3, que contiene 0,05 % de glicina. La siguiente tabla indica las concentraciones de uso del carbamato de etilo y el aumento del rendimiento de Antibiótico (I) atribuido al mismo.

5

TABLA IV

Experi- mento	% de carbamato de etilo añadido al Medio III	Producción de an- tibiótico* (µg/ml)	% de aumento so- bre el control
Control	-	109	-
1	0,01	101	-
2	0,1	112	2,8 %
3	0,5	141	30 %
Control	-	86	-
1	0,3	126	47 %
2	0,4	124	45 %
3	0,5	118	39 %
4	0,6	115	35 %
5	0,7	98	15 %
6	0,8	92	8 %
Control	-	113	-
1	0,1	126	11 %
2	0,2	146	29 %
3	0,3	157	38 %
4	0,4	169	49 %
5	0,5	165	45 %
6	0,6	168	48 %

10

15

20

25



18 MAR

402904

1 * Cada rendimiento es el promedio de 8 determinaciones individuales.

5 Sobre la base de lo que antecede, la adición de 0,4 % de carbamato de etilo al Medio III es la más eficaz para aumentar el rendimiento de Antibiótico (I).

EJEMPLO 5

Producción de antibiótico; adición de amidas

10 Se repite el procedimiento del Ejemplo 1, Etapas A-C, a excepción de que el periodo de incubación en la Etapa C es de 4 días a 28°C y el medio de producción basal tiene la siguiente composición:

Medio IV:

15	Solubles de destilería	3,0 %
	Levadura seca primaria	1,0 %
	Glicina	0,05 %
	L-fenilalanina	0,3 %
	Antiespumante Mobil par-S	0,25 %
	Tiosulfato sódico	0,1 %
	Almidón de maíz	2,0 %

20 Después de agregar las amidas citadas en la siguiente tabla al Medio IV y siguiendo por lo demás el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, Etapa C, se observa un aumento del rendimiento de Antibiótico (I). La Tabla V, infra, describe estas amidas, las concentraciones a las que son empleadas y
25 los aumentos del rendimiento atribuidos a las mismas.

402904



1

TABLA V

Aditivo	Concentración final, %	Producción de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) con aditivo/control	
		n ^o 1	n ^o 2
Formamida	0,25		332/256
	0,50		354/256
N-metilformamida	1,0	285/254	
	2,0	312/254	
N,N-dimetilformamida	0,25	287/238	
	0,40	346/273	301/256
	0,50	297/238	
	0,80	381/273	328/256
	1,0	388/273	387/256
N,N-dietilformamida	0,25	309/254	
	0,5	351/254	
	1,0	391/254	
N,N-dibutilformamida	0,125	260/254	
	0,25	285/254	
N-2-hidroxi- etilformamida	0,25		310/256
	0,50		338/256
	1,0		372/256
N,N-dimetilbenzamida	0,0312		293/256
	0,0625		313/256
	0,125		369/256
N,N-dimetilacetamida	0,5	360/254	
	1,0	354/254	
	2,0	449/254	
N,N-dietilacetamida	0,25	276/238	
	0,5	379/238	
	1,0	335/238	
N,N-dipropilacetamida	0,16	340/238	
	0,31	390/238	
N,N-dimetiltioacetamida	0,063		296/256
	0,125	288/254	330/256
	0,25	145/254	322/256

25

402904 18 MA



1

TABLA V (continuación)

Aditivo	Concentración final, %	Producción de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) con aditivo/control	
		nº 1	nº 2
5 N,N-dimetil-acetoacetamida	0,5	293/254	
	1,0	286/254	
	2,0	380/254	
N,N-dimetilpropionamida	0,5	363/254	
	1,0	369/254	
	2,0	282/254	
N,N-dibutilpropionamida	0,0156		418/256
	0,0312		528/256
	0,0625		350/256
10 N,N-diisobutilpropionamida	0,063		497/256
	0,125		530/256
N,N-dimetilbutiramida	0,125	322/254	
	0,25	303/254	
	0,5	318/254	
15 N,N-dimetilvaleramida	0,063	308/254	
	0,125	325/254	
	0,25	355/254	
N,N-dimetildodecanamida	0,0156		291/256

EJEMPLO 6

Producción de antibiótico; adición de carbamatos

20

Se repite el procedimiento del Ejemplo 5 a excepción de que las amidas allí citadas son sustituidas por diversos carbamatos. La siguiente tabla describe estos carbamatos e indica las concentraciones a las que son empleados y el rendimiento de Antibiótico (I) atribuido a los mismos:

25

402904 18 MAI. 1972



1

TABLA VI

	<u>Aditivo</u>	<u>Concentración final, %</u>	<u>Producción de antibiótico (µg/ml) con aditivo/control</u>	
			<u>nº 1</u>	<u>nº 2</u>
5	carbamato de etilo	0,2	353/254	398/273
		0,4	347/254	395/273
	carbamato de n-propilo	0,1	360/254	386/273
		0,2	348/254	417/273
	carbamato de n-butilo	0,1		345/273
	N-metilcarbamato de etilo	0,2	321/254	360/273
		0,4	333/254	323/273
10	N-etilcarbamato de etilo	0,1	343/254	317/273
		0,2		391/273
	N-propilcarbamato de etilo	0,1	361/254	389/273
		0,2	363/254	409/273
	N-2-hidroxiethylcarbamato de etilo	0,2	331/254	345/273
		0,4	353/254	442/273
		0,3	349/254	428/273
15	N,N-dimetilcarbamato de etilo	0,2		292/273
		0,4		393/273

20

25

402904 18



1

REIVINDICACIONES

5

1. Mejoras introducidas en el método de preparación de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico por cultivo de un nuevo actinomicetes en un medio nutritivo, caracterizadas las mejoras porque consisten en agregar glicina, L-fenilalanina, un carbamato, una amida o combinaciones de estos compuestos al medio de fermentación.

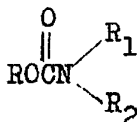
10

2. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que al actinomicetes es Streptomyces lactamdurans.

3. Mejoras según la Reivindicación 2, en las que el pH del medio nutritivo acuoso está comprendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente y contiene entre 1 % y 6 % en peso de hidrato de carbono y entre 0,2 % y 6 % en peso de nitrógeno disponible, aproximadamente.

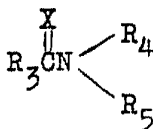
15

4. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que el carbamato es un compuesto de fórmula:



20

donde R es alquilo y R₁ y R₂ son iguales o diferentes y están seleccionados entre hidrógeno, alquilo o hidroxialquilo inferior y la amida es un compuesto de fórmula:



25

R₃



18 MAY 1972

402904

1 donde R_3 es hidrógeno, alquilo, oxoalquilo inferior o arilo
y R_4 y R_5 son iguales o diferentes y están seleccionados en
tre hidrógeno, alquilo o hidroxialquilo inferior.

5 5. Mejoras según la Reivindicación 4, en las que la
amida es formamida o N,N-dialquil(inferior)formamida.

6. Mejoras según la reivindicación 4, en las que la
amida empleada es N,N-di-isobutilpropionamida a una concentra
ción comprendida entre 0,063 % y 0,125 % aproximadamente.

10 7. Mejoras según la Reivindicación 4, en las que el -
carbamato empleado es N-2-hidroxietilcarbamato a una concen--
tración de 0,2 a 0,8 % aproximadamente.

8. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que se
emplea glicina a una concentración de 0,01 a 0,10 % aproxima-
damente.

15 9. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que se
emplea L-fenilalanina a una concentración de 0,05 a 0,3 % apro
ximadamente.

20 10. Mejoras según la Reivindicación 4, en las que el
carbamato o amida se emplean a una concentración de 0,0156 -
2,0 % aproximadamente.

25 11. Mejoras introducidas en el método de preparación
de ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloxime-
til)-7-metoxi-3- cefem-4-carboxílico por cultivo de Streptomy
ces lactamdurans en un medio nutritivo, caracterizadas las me
joras porque consisten en utilizar 0,05 % de glicina, 0,3 %

Rey

40290425



1 de L-fenilalanina, 0,2-0,8 % de N-2-hidroxietilcarbamato de
etilo o 0,063-0,125 % de N,N-di-isobutilpropionamida como
aditivo del medio de fermentación para aumentar el rendi-
miento de antibiótico.

5 12. Mejoras según la Reivindicación 11, en las que
se emplea N-2-hidroxietilcarbamato o N,N-di-isobutilpropio-
namida en combinación con glicina y L-fenilalanina.

13. Mejoras según la reivindicación 4, en las que la
amida es N,N-dimetilformamida.

10 14. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por:
MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL METODO DE PREPARACION DE ACIDO-7-
(D-5-AMINO-5-CARBOXIVALERAMIDO)-3-(CARBAMOILOXIMETIL)-7-ME-
TOXI-3-CEFEM-4-CARBOXILICO.

15 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presentememoria descriptiva que consta de veintisiete pági-
nas mecanografiadas.

Madrid, 18 de mayo de 1.972

BERNARDO UNGRIA

P.P.

20

25