

426272

19 JU



426272

P.- 57.597

~~3.111-324  
Cephalosporin 178~~

F.C. 18-12-75

CL. C12D

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

A nombre de GLAXO LABORATORIES LIMITED

entidad británica

establecida en Greenford, Middlesex, Inglaterra

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA CONVERSION DE UN ACI-  
DO 3-ACILOXIMETILCEF-3-EM-4-CARBOXILICO EN SU  
ANALOGO DE 3-HIDROXIMETILO"

(Clase Internacional C07c)



19 Jun.

426272

Esta invención se refiere a la transformación de compuestos de cefalosporina, y trata particularmente de la hidrólisis catalizada enzimáticamente de las 3-aciloximetil-cefalosporinas.

5 Los compuestos de cefalosporina a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva se nombran por regla general con referencia al "cefam" (J. Am. Chem. Soc. 1962, 84, 3400). El término "cefem" hace referencia a la estructura de cefam con un enlace doble.

10 Los compuestos de 3-hidroximetil-cefalosporina son compuestos intermedios valiosos en la síntesis de una gama de antibióticos de cefalosporina que poseen grupos metilo sustituidos en la posición 3 en virtud de la reactividad química del grupo hidroxilo y de la facilidad consiguiente con la que el grupo hidroximetilo se puede convertir en un grupo metilo sustituido en la posición 3 deseado.

15 Adicionalmente, poseen propiedades antibióticas los ácidos 7-acilamido-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílicos. La preparación de compuestos de 3-hidroximetilcefalosporina por hidrólisis de 3-aciloximetilcefalosporinas, en particular de compuestos de 3-acetoximetilcefalosporina producidos por fermentación

20 y existentes en estado natural, tales como la cefa-

25

426272

15 JUN 1971



losporina C  $\beta$ -ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico y derivados de la misma, p.ej. derivados protegidos en el nitrógeno y compuestos en los cuales el grupo D-5-amino-5-carboxipentanoílo se ha transformado de algún otro modo o se ha eliminado y, si se desea, ha sido reemplazado por otro grupo acilo, presenta, por consiguiente, un interés considerable.

La hidrólisis de los ácidos 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílicos a sus análogos de 3-hidroximetilo por métodos químicos ha resultado impracticable por regla general, ya que tales reacciones van acompañadas por una lactonización rápida y prácticamente irreversible que implica la reacción de los grupos 3-hidroximetilo y 4-carboxilo y/o por la destrucción del sistema cíclico de  $\beta$ -lactama.

Se ha encontrado posible, sin embargo, hidrolizar los ácidos 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílicos por métodos catalizados enzimáticamente en condiciones en las que pueden evitarse de un modo sustancial o total la lactonización y la degradación de la  $\beta$ -lactama. Si bien pueden emplearse esterases derivadas de cierta gama de fuentes, p.ej., fuentes vegetales, en estos métodos catalizados enzimáticamente, pueden encontrarse dificultades prácticas en

426272



19 JUN

el aislamiento de cantidades suficientes de estera-  
sa a partir de algunas de las fuentes; de acuerdo  
con ello, las esterasesas producidas a partir de mi-  
croorganismos son las más convenientes en la prác-  
5 tica, habida cuenta de la facilidad comparativa con  
la que se pueden cultivar los microorganismos en gran  
escala utilizando técnicas de fermentación clásicas  
para proporcionar un suministro disponible de la es-  
terasa.

10 La presente invención está basada en el  
descubrimiento de los autores de la invención de que  
las esterasesas obtenidas a partir de microorganismos  
de tipo levadura del género Rhodotorula y mutantes  
de los mismos promueven ventajosamente la hidrólisis  
15 de los ácidos 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílicos  
a sus análogos de 3-hidroximetilo y poseen ventajas  
sustanciales sobre las esterasesas producidas a partir  
de microorganismos propuestas previamente.

20 De acuerdo con un aspecto de la presente  
invención, por tanto, se proporciona un procedimien-  
to para la conversión de un ácido 3-aciloximetilcef-  
3-em-4-carboxílico en un análogo de 3-hidroximetilo  
del mismo por hidrólisis, caracterizado por el hecho  
de que la hidrólisis es catalizada por una esterasa  
25 producida cultivando un microorganismo de tipo leva-

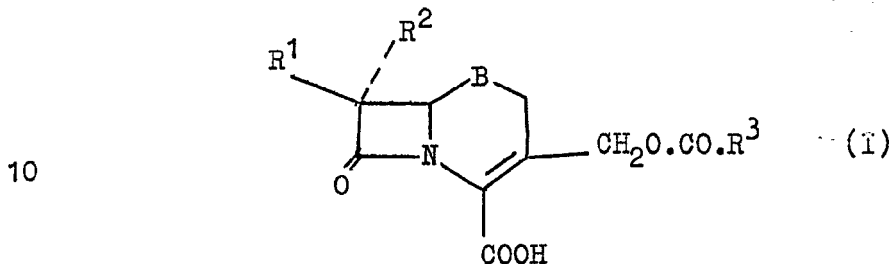
426272

19 JUN.



dura o un mutante del mismo del género Rhodotorula.

Los ácidos 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílicos que se pueden hidrolizar de acuerdo con la invención incluyen compuestos representados por la fórmula general



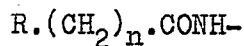
en la que  $R^1$  es un grupo amino o un grupo amino bloqueado, por ejemplo un grupo acilamido carboxílico de 1 a 20 átomos de carbono;  $R^2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, alcoxi inferior, alcoholtilio inferior o alcanóilo inferior (designando el término "inferior", tal como se utiliza en esta memoria, grupos que contienen no más de 8, preferiblemente no más de 6 átomos de carbono);  $R^3.CO$  es un grupo acilo carboxílico que contiene de 2 a 20 átomos de carbono; y B es  $>S$  ó  $>S \rightarrow O$  ( $\alpha$ - ó  $\beta$ -).

Los grupos acilamido  $R^1$  que pueden estar presentes en los compuestos de fórmula I incluyen el grupo D-5-amino-5-carboxipentanamido encontrado

426272



en compuestos producidos por fermentación que se encuentran en estado natural tales como la cefalosporina C; derivados protegidos en el nitrógeno del grupo D-5-amino-5-carboxipentanamido, p.ej., aquéllos  
5 en los que el grupo amino está sustituido por un grupo protector del tipo descrito en cualquiera de las Memorias Descriptivas de Patente Británica Núms. 1.041.985; 1.302.015 ó 1.313.207, por ejemplo un grupo alcoholo inferior, un grupo aril-alcoholo inferior,  
10 un grupo arilo (p.ej. 2,4-dinitrofenilo) o un grupo acilo, en particular un grupo alcanóilo inferior (p.ej. acetilo, propionilo o butirilo), un grupo  $\alpha$ -halo- ó  $\alpha, \alpha$ -dihalo-alcanóilo inferior (p.ej. cloroacetilo o dicloroacetilo), un grupo aroílo (p.  
15 ej., benzoílo, clorobenzoílo, nitrobenzoílo o tosi- lo), un grupo alcoxicarbonilo inferior (p.ej., t-butoxicarbonilo), un grupo aril-alcoxicarbonilo inferior (p.ej., benciloxicarbonilo) o un grupo diacilo tal como ftaloílo; un grupo acilamido obtenido por  
20 transformación del grupo D-5-amino-5-carboxipentanamido, p.ej., un grupo 4-carboxibutamido obtenido a partir de aquél mediante, por ejemplo oxidación enzimática; formamido; un grupo de fórmula



25 donde R es un grupo arilo carbocíclico o heterocí-

426272



clico (p.ej., fenilo; fenilo sustituido por uno o más de entre halógeno, hidroxilo, alcoholo inferior, nitro, amino, alcanóilo inferior, alcoxi inferior o alcoholtilio inferior; tienilo o furilo) o un grupo  
 5 ariloxi, ariltio, aril-alcoxi inferior o aril-alcoholtilio inferior (p.ej., fenoxi, feniltio, 5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltio o benciltio) y n es un número entero comprendido entre 1 y 4; un grupo de la fórmula



en la que  $R^a$  es un grupo arilo (p.ej., un grupo arilo carbocíclico monocíclico o bicíclico tal como fenilo, naftilo, o fenilo sustituido por uno o más de  
 15 entre halógeno, hidroxilo, alcoholo inferior, nitro, amino, alcanóilo inferior, alcoxi inferior o alcoholtilio inferior) y X es amino, amino protegido (p.ej., que contiene cualquiera de los grupos protectores en el nitrógeno que se han expuesto arriba en relación con el grupo D-5-amino-5-carboxipentanamido,  
 20 por ejemplo un grupo t-butoxicarbonilo), carboxilo, carbalcoxi o hidroxilo; y un grupo de la fórmula



426272

19



en la que  $R^a$  tiene el significado arriba definido (p.ej. en la que  $R^a$  es fenilo, fenilo sustituido, naftilo, tienilo, furilo o piridilo), y  $R^b$  es hidrógeno, acilo (p. ej., alcanóilo inferior), alcohol inferior (p.ej. metilo, etilo, propilo o butilo), cicloalcohol (p.ej., que contiene de 5 a 7 átomos de carbono, tal como ciclopentilo o ciclohexilo), arilo (p. ej. arilo carbocíclico tal como fenilo) o aril-alcohol inferior (p.ej. bencilo o fenetilo). Ejemplos de grupos  $R^1$  que caen dentro de las fórmulas generales arriba indicadas que pueden estar presentes en los compuestos de fórmula I incluyen fenilacetamido, tienilacetamido, 2-hidroxi-2-fenilacetamido, 2-t-butoxi-carbonilamino-2-fenilacetamido y sin-2-furil-2-metoxi-iminoacetamido.

Los grupos acilo  $R^3.CO$  que pueden estar presentes en los compuestos de la fórmula I incluyen una gama de grupos alifáticos, aralifáticos y aromáticos, por ejemplo grupos alcanóilo inferior tales como acetilo, propionilo y butirilo; grupos alquenoóilo inferior tales como crotonoóilo; grupos aril-alcanóilo inferior tales como fenil-acetilo; y grupos arcoóilo tales como benzoóilo. Como se ha indicado arriba, el procedimiento de la invención encuentra una aplicación particular en la hidrólisis

426272

19 JUN



de la cefalosporina C y derivados de la misma, esto es, compuesto de la fórmula I en los que  $R^3.CO$  es un grupo acetilo.

Los grupos  $R^2$  y B de la fórmula I representan preferiblemente hidrógeno y  $>S$ , respectivamente.

El microorganismo de tipo levadura a partir del cual se obtiene la esterasa puede conservarse convenientemente mediante liofilización en una suspensión de suero al 2% en ampollas de vidrio herméticamente cerradas. El cultivo liofilizado puede reconstituirse por adición de agua estéril. Los organismos puestos de nuevo en suspensión se pueden cultivar mediante, por ejemplo, veteado sobre un medio nutritivo sólido, p.ej., un medio acuoso que contenga 2% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 1% de peptona y 0,5% de dihidrógeno-fosfato de potasio, solidificado con 2% de agar (estando expresados todos los porcentajes en peso/volumen), a un pH de 5,6. Los cultivos superficiales se dejan crecer, p. ej., a 25°C, hasta que el agar queda cubierto y pueden conservarse después durante varios meses a temperaturas bajas, p.ej., a 5°C. El organismo puede dejarse crecer en un cultivo sumergido, convenientemente a 25°C, mediante, por ejemplo, inoculación de un me-

426272

19 JUN



5 dio nutriente líquido con una muestra del cultivo de superficie; un ejemplo de un medio nutriente adecuado para este fin es el descrito arriba para el cultivo de superficie sin el agar. En muchos casos es conveniente mantener un cultivo líquido del organismo que puede utilizarse para inocular cultivos líquidos subsiguientes, p.ej., cultivos en escala de producción, ya que esto evita la pesadez de un gran número de inoculaciones de superficie a líquido y permite la utilización de una cantidad mayor de inoculante. La suspensión de levadura obtenida después de la incubación de un tal cultivo líquido subsiguiente durante un tiempo apropiado, p.ej., alrededor de 3 días, convenientemente a 25°C, puede utilizarse después como una fuente de la esterasa empleada para desacilar el material de partida constituido por el ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico.

20 La formación de la esterasa puede mejorarse en ciertos casos por adición de un inductor al medio de cultivo líquido. Inductores adecuados incluyen cefalosporina C, la cefalotina /ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(tien-2-il)-acetamidocef-3-em-4-carboxílico/ y sus sales (p.ej., sales de metal alcalino tales como la sal de potasio), habiéndose encon-

426272

19 JUN. 1974



trado efectivos inductores tales como la cefalosporina C potásica en cantidades menores de 0,1% peso/vol. El inductor se añade convenientemente al medio de cultivo líquido después de la esterilización. El inductor puede esterilizarse haciéndolo pasar a través de un filtro estéril, mientras que el medio de cultivo se puede esterilizar mediante, por ejemplo, tratamiento en autoclave a aproximadamente 121°C y 10.500 kg/m<sup>2</sup>, p.ej., durante 15 minutos.

La esterasa se puede emplear de varias maneras diferentes para hidrolizar el material de partida constituido por el ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico. Así, por ejemplo, una muestra del medio de cultivo líquido puede emplearse por sí misma como fuente de esterasa, si se desea después de la rotura de las células de la levadura, por ejemplo por métodos convencionales tales como tratamiento con ultrasonidos o tratamiento con enzimas líticas. Puede utilizarse análogamente un extracto acuoso de la suspensión resultante de tal rotura de las células. Alternativamente, se pueden emplear células enteras separadas por filtración del medio cultivado líquido, al igual que se puede emplear el filtrado correspondiente; en los casos en que se desee utilizar el filtrado, las células pueden romperse de nue-

426272

19 JUN 1974

vo, p.ej., como se ha descrito arriba, antes de la filtración.

El empleo de células enteras es particularmente ventajoso por el hecho de que éstas pueden separarse fácilmente, por ejemplo en forma de una suspensión de células, del medio cultivado líquido; se conservan fácilmente, p.ej., en forma de una pasta desecada o congelada a temperatura muy baja que se puede añadir directamente a la mezcla de reacción de hidrólisis; y son fácilmente separables, p.ej., por filtración, de la mezcla de reacción después que ha terminado la hidrólisis. Las células así separadas pueden volver a ser utilizadas, p.ej., después de lavado con agua, para hidrolizar muestras ulteriores del material de partida constituido por el ácido 3-aciloximetil-cef-3-em-4-carboxílico. Se ha encontrado que puede conservarse suficiente actividad de esterasa para dar un producto de cefalosporina hidrolizada de calidad satisfactoria con un rendimiento conveniente a lo largo de tantas como siete recirculaciones de las células, lo que hace que esta realización del procedimiento sea notablemente ventajosa desde el punto de vista económico.

Si se desea, las células enteras pueden inmovilizarse en el seno de una matriz inerte o so-

426272



19 JUL

bre ella (p.ej., un polímero o una membrana), por ejemplo mediante unión covalente a un polímero inorgánico u orgánico o mediante inclusión en el seno de una fibra o sobre ella (p.ej., triacetato de celulosa) o en el interior de una envoltura tal como un glóbulo, antes de su adición a un sistema de reacción de hidrólisis, con el fin de proteger las células y reducir al mínimo las pérdidas durante su recirculación. Una matriz preferida para uso en la inmovilización de las células es un gel de poliacrilamida.

La esterasa se puede emplear también en forma exenta de células, obtenidas por ejemplo por precipitación a partir de un filtrado o extracto de células derivado del medio cultivado líquido como se ha descrito anteriormente en esta memoria, utilizando un precipitante de proteína adecuado, por ejemplo una sal o un disolvente. La esterasa exenta de células precipitada puede, por ejemplo, añadirse directamente a un sistema de reacción de hidrólisis o puede disolverse en agua y añadirse en forma de una solución acuosa.

Alternativamente, la esterasa se puede emplear en forma inmovilizada, p.ej. por insolubilización o inclusión, sobre una matriz inerte o en el interior de la misma, incluyendo las formas inmovi-

426272

19 JUN.



lizadas adecuadas las que se han descrito en la Pa-  
tente Británica Núm. 1.224.947 y en la Patente Bel-  
ga Núm. 782.646. Así, por ejemplo, una esterasa ob-  
tenida a partir de un extracto del medio cultivado  
5 líquido o por redisolución de esterasa precipitada  
se puede unir covalentemente a un polímero inorgáni-  
co u orgánico inerte por lo demás, se puede incluir  
en la superficie o en el interior de una fibra (p.  
ej., un polímero fibroso tal como triacetato de ce-  
10 lulosa), o en la superficie o el interior de una mem-  
brana o un polímero tal como un gel de poliacrilami-  
da, se puede adsorber sobre una resina de cambio de  
ion, o se puede ocluir en el interior de una envol-  
tura tal como un glóbulo. Esterasas inmovilizadas  
15 de estos tipos pueden emplearse ventajosamente en  
procedimientos por cargas en los que la esterasa  
ha de volver a utilizarse y en la hidrólisis de un  
flujo continuo de ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-  
carboxílico mediante, por ejemplo, paso a través de  
20 una columna que contiene la esterasa inmovilizada.

La reacción de hidrólisis se inicia conve-  
nientemente poniendo en contacto la esterasa con  
un medio acuoso que contiene el ácido 3-aciloxime-  
tilcef-3-em-4-carboxílico o una sal (p.ej., una sal  
25 de metal alcalino tal como la sal de sodio o de po-

426272

19 JUN.



tasio) del mismo, conteniendo convenientemente el medio de 0,5 a 10% peso/vol del compuesto de cefalosporina. El medio puede, si se desea, esterilizarse antes de la hidrólisis, pero se ha encontrado que  
5 la reacción no requiere que se mantengan condiciones estériles, y de acuerdo con ello la hidrólisis puede llevarse a cabo ventajosamente en condiciones no estériles.

En los casos en que el ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico es una cefalosporina producida por fermentación, como en el caso de la cefalosporina C, el caldo de fermentación obtenido a partir del cultivo del organismo productor de cefalosporina (p.ej., un organismo del género Cephalosporium tal como Cephalosporium acremonium Brotzu) puede tratarse por sí mismo con la esterasa, evitándose la necesidad de una separación intermedia del compuesto de cefalosporina. El micelio puede, si se desea, separarse del caldo antes del tratamiento, pero en muchos casos será más conveniente emplear el  
10  
15  
20  
caldo total directamente.

Por regla general, la hidrólisis se lleva a cabo ventajosamente a un pH comprendido entre 4 y 8. El pH puede mantenerse a lo largo de toda la reacción mediante el empleo de un tampón, p.ej., tampón  
25

426272

19 JUN. 1974



de fosfato, por ejemplo en un valor de pH 6,0. La hidrólisis se efectúa convenientemente a la temperatura ambiente, esto es, a aproximadamente 25°C, ventajosamente con agitación y/o aireación de la mezcla de reacción.

La cantidad de esterasa o material que contiene esterasa requerida(o) en una reacción dada puede calcularse fácilmente mediante operaciones previas de tanteo en pequeña escala, dado que se ha encontrado que el procedimiento se ajusta bien a la regla de escalación.

El tiempo requerido para que se efectúe la desacilación completa del ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico dependerá de la naturaleza del material de partida y de la esterasa, así como de las condiciones de reacción empleadas, pero típicamente no será mayor de 70 horas. El curso de la reacción se puede seguir convenientemente separando el producto por cromatografía de capa delgada o cromatografía sobre papel utilizando una combinación apropiada de sistema soporte/disolvente y ensayando densitométricamente.

En los casos en que el material de partida del ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico posee un grupo D-5-amino-5-carboxipentanamido en la

426272

19 JUN.



posición 7, tal como ocurre en el caso de la cefalosporina C, el procedimiento de desacilación hidrolítica de la invención puede combinarse con la desaminación oxidante catalizada por enzimas del grupo  
5 de la posición 7, por ejemplo a un grupo 4-carboxi-  
butanamido por tratamiento con una oxidasa fúngica, especialmente una oxidasa derivada de la levadura Trigonopsis variabilis como se describe en la Patente Británica Núm. 1.272.769 y en la Patente Belga  
10 Núm. 782.393. La transformación enzimática de los grupos de las posiciones 3 y 7 puede efectuarse bien sea sucesivamente o simultáneamente.

El método utilizado para aislar el producto de ácido 3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico de-  
15 penderá de la naturaleza del producto y del sistema de reacción, pero en general se emplearán técnicas convencionales. Así, por ejemplo, si se utilizan células enteras como fuente de la esterasa, éstas pueden separarse (y si se desea recircularse) por fil-  
20 tración o centrifugación y la solución puede clarificarse ulteriormente por filtración, p.ej., a través de un lecho de tierra de diatomeas. Cuando el ácido 3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico es la desacetil-cefalosporina C, ésta puede aislarse median-  
25 te, por ejemplo, desalificación de la solución por

426272

19 JUN.



adsorción sobre carbono seguida por elución con acetona y agua, purificación ulterior del producto eluido por adsorción sobre una resina de cambio de ion (por ejemplo, Amberlite IRA-68 en la forma de acetato), elución de la desacetil-cefalosporina de la resina con solución de acetato de potasio, y precipitación del producto con acetona. Otras técnicas que se pueden emplear en el aislamiento de diferentes productos de cefalosporina incluyen la extracción con disolventes, la precipitación con ácidos, y la precipitación en el punto isoelectrico (en el caso de productos de doble polaridad tales como el ácido (6R,7R)-7-amino-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico).

Además de las ventajas arriba descritas y de la conveniencia práctica que puede acompañar al empleo de células enteras como fuente de esterasa en una realización del presente procedimiento, el procedimiento de la invención es cómodo en general en virtud de la facilidad con la que los microorganismos del género Rhodotorula pueden cultivarse para proporcionar una fuente de la esterasa, la reproducibilidad de la reacción de hidrólisis cuando se utiliza la esterasa derivada de Rhodotorula, y la facilidad con que puede calcularse la cantidad

426272

19 JUN. 1974



de esterasa requerida.

Si bien se ha encontrado que diversas especies del género Rhodotorula son efectivas, se prefiere emplear organismos de las especies Rhodotorula rubra, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula glutinis var. dairenensis y Rhodotorula graminis, habida cuenta de la hidrólisis particularmente eficiente de los ácidos 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílicos que es favorecida por las esterasas producidas por estos organismos. El procedimiento se lleva a cabo cómodamente utilizando cultivos de especies tipo de estos organismos (obtenidas del Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Delft, Países Bajos), es decir, utilizando las cepas Rhodotorula rubra CBS 17, Rhodotorula glutinis CBS 20, Rhodotorula glutinis var. dairenensis CBS 4406 y Rhodotorula graminis CBS 2826.

Una cepa adicional de Rhodotorula rubra que ha resultado ser particularmente efectiva en el presente procedimiento es la depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures bajo el número CBS 6469. Esta cepa tiene las siguientes características:

Después de 24 y 72 horas de cultivo en un medio líquido de malta-levadura-glucosa-peptona, las

426272

19 JUN.



células eran cortas y ovaladas, de dimensiones 2 a 4,5 micras por 2,5 a 5,5 micras, y se hallaban aisladas o formando pares. Al cabo de un mes de cultivo, se encontró un depósito que no floculaba, no se observó película ni anillo alguno de células en la superficie del líquido, y sólo una cantidad muy escasa de cultivo que ascendía por las paredes del tubo.

Al cabo de 72 horas de cultivo sobre agar de malta-levadura-glucosa-peptona, las células eran esféricas a ovaladas, de 2 a 5 micras por 2,5 a 7 micras, y se encontraban aisladas o formando pares. Al cabo de un mes, un cultivo veteado presentaba células de color rojo clavel brillante, muy lustrosas y muy uniformes.

No se apreció desarrollo pseudomicelial alguno al cabo de 4 semanas en cultivos de portaobjetos utilizando agar de dextrosa de patata o agar de harina de maíz, y tampoco se apreció formación alguna de esporas al cabo de 3 ó 4 semanas y media sobre zanahorias, agar de acetato de sodio o agar de Gorodkova.

Al cabo de 3 semanas, no se observó formación alguna de gas por el método del tubo de Durham durante la fermentación de azúcar utilizando dex-

426272

19 JUN



trosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, trehalosa o almidón soluble.

Se observó el crecimiento al cabo de 1,  
5 2 y 3 semanas en un medio líquido utilizando lo que sigue como fuente única de carbono: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, L-sorbosa (desarrollo latente, que apareció al cabo de 2 semanas), celobiosa, trehalosa, rafinosa, melecitosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa (desarrollo latente que apareció al cabo de 1 semana), etanol, glicerina, ácido succínico, adonita, D-manita, D-sorbita y salicina. No se observó crecimiento alguno en las mismas condiciones utilizando lactosa,  
15 melibiosa, almidón soluble, inulina, ácido láctico, eritrita, dulcita,  $\alpha$ -metil-glucósido e inosita.

Se observó el crecimiento al cabo de 1,  
2 y 3 semanas en un medio líquido utilizando sulfato de amonio y clorhidrato de etilamina como fuente  
20 única de nitrógeno, pero no se produjo asimilación alguna de los nitratos.

Los ensayos de hidrólisis de grasas y producción de almidón resultaron negativos; la separación de arbutina fue positiva. No se observó crecimiento alguno en un medio de presión osmótica 60%

426272

19 JU



y sólo un escaso crecimiento al cabo de 16 días en un medio líquido exento de vitaminas. Se apreció crecimiento en presencia de 100 partes por millón de actidiona en medio líquido.

5 Utilizando el medio de Gorodkova que contiene creta, no se observó clarificación alguna del medio durante el crecimiento o desarrollo del organismo, lo cual indicaba la ausencia de producción de ácido.

10 Esta cepa se utilizó en los Ejemplos 1 a 11 y 14 a 16.

Los cultivos de especies tipo de las especies del género *Rhodotorula* utilizadas en los Ejemplos 12 y 13 se obtuvieron del Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Los Ejemplos que siguen se dan ahora a modo de ilustración únicamente. Todas las temperaturas se hallan expresadas en °C.

Ejemplo 1

20 Preparación del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico

Se disolvió (6R,7R)-3-acetoximetil-7(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxilato de potasio (500 g, aproximadamente de 70% de pureza) en agua y se esterilizó haciéndolo pasar a través

426272

19 JUN.



de un taco de asbesto estéril. Se añadió la solución a 2 litros de tampón de fosfato estéril (400 mM, pH 6) en una botella de 10 litros, a la cual se añadieron después aproximadamente 2 litros de una suspensión de Rhodotorula rubra cultivada durante 3 días sobre un medio nutriente suplementado con 1% peso/vol. de ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico. El volumen final fue aproximadamente de 8 litros y la mezcla se agitó utilizando un agitador magnético y se aireó por borboteo de aire estéril a razón de 2 litros por minuto.

Se demostró cromatográficamente que, al cabo de 60 horas de incubación a la temperatura ambiente, más del 90% de la cefalosporina estaba presente como ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico. El caldo se clarificó por centrifugación, y el pH se ajustó a 4,5 antes de llevar la carga a una columna rellena con carbono. Después de cargar la columna con el caldo, se lavó el carbono con agua desmineralizada enfriada (4 veces el volumen del lecho) y se eluyó con acetona acuosa al 40% (4 veces el volumen de la columna). Se adsorbió el producto de la elución sobre una columna de resina de cambio de anión Am-

426272



19 JUN 1974

berlite IRA-68 en la forma de acetato y se lavó con agua desmineraliza enfriada (2 veces el volumen de la columna). La columna se eluyó luego con acetato de potasio 0,1 M y el producto de la elución se trató con acetona (5,75 volúmenes). El precipitado resultante se separó y se secó al aire a 35° para dar el compuesto del título (68%, con pureza del 68%), con características físicas similares a las de una muestra auténtica.

10 Ejemplo 2

Preparación del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico

Se recogió asépticamente el caldo de una fermentación de cefalosporina C (Cephalosporium acremonium Brotzu). Cuatro litros del caldo total se transfirieron a un fermentador estéril de 5 litros. El pH del caldo se ajustó a 5,0 con ácido fosfórico 5N y el caldo se agitó a 800 revs./min. Se introdujo en el fermentador aire estéril a un caudal de 3 litros/minuto. Se suministró una solución de glucosa al 50% peso/vol. a razón de 7,0 ml/hora para prevenir la autólisis del organismo de Cephalosporium. Se mantuvo el pH en el intervalo de 5,0 a 5,5 por adición de ácido fosfórico 5N cuando fue preciso.

25 Se inoculó el cultivo con 400 ml de caldo

426272

19 JUN. 1974



de Rhodotorula rubra que se preparó cultivando el organismo a 25° durante 36 horas en un medio de cultivo que contenía 2,2% peso/vol. de glucosa, 0,25% peso/vol. de nitrógeno como licor de maceración de maíz, 0,5% peso/vol de dihidrógeno-fosfato de potasio y 0,1% peso/vol. de una mezcla 1:1 de polipropilenglicol y aceite mineral blanco (el pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización). Después de la esterilización, se añadió al medio de cultivo una solución de (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxilato de potasio para dar una concentración de 0,1% peso/vol.

Se tomaron muestras del cultivo mixto para su ensayo. Se centrifugó el caldo a 3000 revs./min. durante 15 minutos, y se analizaron las sustancias sobrenadantes por cromatografía de capa delgada. Al cabo de 12 horas, no quedaba nada de cefalosporina C en la muestra, y se había producido un nuevo compuesto identificado como ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico. La concentración de este compuesto era 6,2 mg/ml.

Subsiguientemente, se filtraron 4 litros del cultivo mixto a través de un lecho de coadyuvante de filtración después de ajustar el pH a 4,5 y

426272

19 JUN



se separó el ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxi-  
pentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico  
del filtrado de una manera similar a la indicada en  
el Ejemplo 1. El producto se secó al aire a 35°C pa-  
5 ra dar 17,1 g del compuesto del título con una pu-  
reza de 76,8% expresada como el ácido libre.

Ejemplo 3

Preparación del ácido (6R,7R)-3-hidroximetil-7-(tien-  
2-ilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico

10 Se disolvió ácido (6R,7R)-2-acetoximetil-  
7-(tien-2-ilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico (210  
g, 97,7% como sal de sodio) en agua desmineralizada  
(2 litros) y se esterilizó haciéndolo pasar a tra-  
vés de un filtro de asbesto estéril. Se añadió el  
15 filtrado a 4 litros de tampón de fosfato 0,5 M (pH  
6,0), el cual se había tratado en autoclave en una  
botella de 10 litros a 1400 kg/m<sup>2</sup> durante 30 minutos.  
La solución tamponada del ácido (6R,7R)-3-acetoxime-  
til-7-(tien-2-ilacetamido)-cef-3-em-4-carboxílico  
20 se inoculó con 2 litros de un cultivo de Rhodotorula  
rubra cultivado durante 3 días a 25° en un aparato  
rotativo de sacudidas en presencia de 1% peso/vol.  
del ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(tien-2-ilaceta-  
mido)cef-3-em-4-carboxílico.

25 Se aireó el cultivo a razón de 3 litros

426272

19 JUN 1974



por minuto y se agitó utilizando un agitador magnético. La temperatura ambiente era de 25<sup>o</sup>, y el pH del cultivo estaba comprendido entre 6,0 y 6,4 en todo momento. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo para analizarlas por cromatografía de capa delgada contra soluciones patrón del ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(tiem-2-ilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico y del compuesto del título. Se consiguió una conversión completa al cabo de 67 horas. La graduación final era de aproximadamente 25.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y el volumen 6.630 ml.

Los sistemas preferidos para el ensayo de los compuestos de partida y final fueron los siguientes:

Se sumergieron placas de celulosa previamente recubierta (MN300, Camlab Cambridge) en tampón de acetato 0,1 M (pH 5,0) y se secaron lentamente. Se preparó el sistema de disolvente agitando mediante sacudidas 8 volúmenes de acetato de etilo, 1 vol. de n-butanol y 8 vols. de tampón de acetato durante 2 horas. Se desechó la fase acuosa y se utilizó la fase orgánica para irrigar placas. Se puso 1  $\mu\text{l}$  de una muestra adecuadamente diluida en el origen y se utilizó a fines de comparación 1  $\mu\text{l}$  de soluciones patrón que contenían 5000  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Las placas

426272

19 J



se desarrollaron durante aproximadamente 45 minutos, se secaron y se irradiaron con luz ultravioleta durante 10 min. ( $\lambda_{\text{máx}}$  253 nm), y las cefalosporinas separadas se cuantificaron densitométricamente.

5 La naturaleza no polar del grupo tienila-  
cetamido de la posición 7 permite que el compuesto que tiene el grupo hidroximetilo en la posición 3 sea extraído con disolventes, por ejemplo como sigue:

A los 6.630 ml de caldo, se añadió forma-  
10 lina (130 ml) para destruir la levadura. Después de dejar en reposo, se decantó el líquido sobrenadante y se extrajo en cargas de 1000 ml como sigue: Se ajustó el pH de la solución a 2,2-2,5 y se añadieron 2 litros de acetato de butilo. Se extrajo de nuevo la  
15 fase acuosa con acetato de butilo (200 ml). Se combinaron las fracciones de acetato de butilo (2000 ml) y se añadió gota a gota una solución de acetato de potasio al 12,5% en alcohol desnaturalizado industrial hasta que dejó de producirse precipitación.  
20 Se filtró el producto y se lavó con acetona. La eficiencia de extracción del caldo para obtener la sal de potasio fue mayor del 70%, y la pureza del producto era elevada. El punto de fusión con descomposición de 194 a 198° es el mismo que ha sido publicado para  
25 el compuesto del título puro y auténtico.

426272

19 JUN 1964



Ejemplo 4

Preparación del Acido (6R,7R)-3-hidroxiacetil-7-(tien-2-ilacetamido)-cef-3-em-4-carboxílico

(a) Una suspensión de Rhodotorula rubra (1 kg) preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1 y conservada por congelación, se añadió a agua destilada (10 litros) y, con agitación, se añadieron también (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(tien-2-ilacetamido)-cef-3-em-4-carboxilato de sodio (500 g), dihidrogeno-ortofosfato de potasio (250 g) e hidrogeno-ortofosfato disódico (28,5 g). Se agitó enérgicamente la mezcla (pH 5,8) mientras que se hizo penetrar en su interior una corriente rápida de aire. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice desarrolladas en solución de cloruro de sodio 0,5 M y visualizadas con luz ultravioleta. Al cabo de 34 horas, había desaparecido totalmente el material de partida. La levadura se separó por centrifugación y se conservó, y el líquido sobrenadante se clarificó por filtración a través de un lecho de tierra de diátomeas.

El filtrado se acidificó con rapidez a pH 2,1 con solución de ácido ortofosfórico al 10%, mientras que se agitaba a la temperatura ambiente, y el sólido que precipitó se separó por filtración lo más

426272



rápida-mente posible y se lavó a fondo con agua des-  
tilada hasta que los lavados estuvieron exentos de  
ácido. El ácido (6R,7R)-3-hidroximetil-7-(tien-2-  
ilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico se secó a vacío  
5 a 40° y su cantidad ascendió a 364 g (86% de la can-  
tidad teórica). Dió una solución clara en metanol  
y en solución de bicarbonato de sodio al 5%, y te-  
nia un valor  $[\alpha]_D^{25} = +135^{\circ}$  (c 1%, MeOH). Los espec-  
tros ultravioleta, infrarrojo y rmp eran similares  
10 a los publicados para el compuesto del título autén-  
tico.

(b) Reutilización de la Rhodotorula rubra

La Rhodotorula rubra, recuperada como se  
ha indicado arriba en (a), se suspendió en agua (10  
15 litros) y se añadieron (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(tien-  
2-ilacetamido)-cef-3-em-4-carboxilato de sodio (500  
g), dihidrogeno-ortofosfato de potasio (250 g) e hi-  
drogeno-ortofosfato disódico (28,5 g), llevándose  
a cabo aireación y agitación como se ha indicado arri-  
20 ba en (a). La cromatografía de capa delgada mostró  
que la reacción era completa al cabo de 22 horas,  
después de lo cual se aisló el producto como en (a)  
arriba, ascendiendo su cantidad a 367 g (86,5% de  
la cantidad teórica). Las soluciones en metanol y  
25 en solución de bicarbonato de sodio eran claras;

426272

19 JUN



$[\alpha]_D = 136^{\circ}$ . Los espectros ultravioleta, infrarrojo y rmp eran similares a los publicados para el compuesto del título auténtico.

La levadura volvió a utilizarse 6 veces más para dar un producto de calidad satisfactoria con rendimientos similares.

Ejemplo 5

Preparación del ácido (6R,7R)-7- $\beta$ -(fur-2-il)-2-metoxiiminoacetamido-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico (isómero sin)

Se disolvió (6R,7R)-3-acetoximetil-7- $\beta$ -(fur-2-il)-2-metoxiiminoacetamido-3-em-4-carboxilato de sodio (isómero sin) (5,0 g, 11,0 milimoles) en una solución tampón agitada que contenía dihidrogeno-ortofosfato de potasio (1,23 g) e hidrogeno-ortofosfato disódico (0,144 g), en agua destilada (100 ml). Se añadió una suspensión congelada de Rhodotorula rubra (10 g) y la mezcla se agitó mecánicamente y se aireó continuamente a la temperatura ambiente durante 32 horas. La cromatografía de capa delgada sobre sílice con revelado en cloruro de sodio 0,5 M y visualización por luz ultravioleta demostró que la hidrólisis había sido completa. Se separaron las células de levadura por centrifugación, y el líquido sobrenadante claro se enfrió a 2° y se

426272

19 JUN



trató con 4-metilpentan-2-ona (100 ml). Se añadió ácido ortofosfórico (solución acuosa al 20%) a la mezcla agitada hasta que el pH fue de 2,0. Se continuó la agitación durante tres minutos y el producto se aisló luego rápidamente por filtración, se lavó con 4-metilpentan-2-ona (2 x 10 ml), salmuera (1 x 10 ml), y agua a 0° (2 x 10 ml) y se secó a 40° a vacío para dar el compuesto del título (3,25 g, 77,5% del rendimiento teórico). El producto se equilibró en la atmósfera y tenía un valor  $\lambda_{\text{máx}}$  (pH 6) de 275 nm ( $\epsilon$  17.050); los espectros infrarrojo y rmp y el análisis elemental estuvieron de acuerdo con la estructura asignada; la pureza por cromatografía en fase líquida a alta presión (CIAP) era del 98,2%.

#### Ejemplo 6

#### Preparación del ácido (6R,7R)-7-amino-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico

(6R,7R)-3-acetoximetil-7-aminocef-3-em-4-ácido carboxílico-toluen-p-sulfonato dihidratado (5,0 g) se suspendió en agua destilada (100 ml) a la temperatura ambiente. Se añadió solución de hidróxido de amonio (densidad relativa 0,880) hasta que se obtuvo la disolución completa (pH 7,6). Se trató la solución con 10 g de una suspensión congelada

426272



a temperatura muy baja de Rhodotorula rubra. La suspensión se agitó mecánicamente y se aireó continuamente durante 30 horas a la temperatura ambiente, transcurrido cuyo tiempo la hidrólisis se había completado en un 95% (comprobada sobre placas de sílice en capa delgada, con revelado en cloruro de sodio 0,5 M y visualización bajo luz ultravioleta).

Las células de levadura se separaron por centrifugación, y el líquido sobrenadante claro, después de la decantación, se enfrió a 10°. Se ajustó el pH a 3,6 con ácido ortofosfórico al 20%, y el producto se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó a 40° a vacío para dar el compuesto del título (1,23 g, el 52,0% de la cantidad teórica),  $\lambda_{\text{máx}}$  (pH 6) 264,5 nm ( $\epsilon$  7.000); pureza por CLAP, 94%. Los espectros infrarrojo y rmp estaban de acuerdo con la estructura asignada.

#### Ejemplo 7

Preparación del ácido (6R,7R,2'R)-7-(2'-t-butoxicarbonilamino-2'-fenilacetamido)-3-hidroxi-3-em-4-carboxílico

Una suspensión de ácido (6R,7R,2'R)-3-acetoximetil-7-(2'-t-butoxicarbonilamino-2'-fenilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico (14,67 g) en agua (100 ml) se llevó a pH 6 con hidróxido de sodio 2N. La

426272

19 J



solución resultante se diluyó con tampón de fosfato  
0,4 M de pH 6 (100 ml) y se añadió una pasta conge-  
lada de células enteras obtenidas por cultivo de  
Rhodotorula rubra (60 g). La suspensión se agitó  
5 enérgicamente, haciendo borbotear aire a través de  
la mezcla, durante 28 horas. Se centrifugó la mez-  
cla y la solución sobrenadante se decantó y se tra-  
tó con cloruro de sodio (35 g). La solución (que  
contenía algo de material gelatinoso) se clarificó  
10 con tierra de diatomeas. El filtrado se trató con  
acetato de etilo (500 ml) y se enfrió a 5°, después  
de lo cual se llevó a pH 2 con ácido fosfórico al  
25%, agitando enérgicamente. La emulsión resultante  
se filtró a través de un embudo de vidrio sinteriza-  
15 do y la fase orgánica se separó y se lavó con sal-  
muera, secándose después. La tierra de infusorios  
obtenida arriba se lavó con agua (200 ml) y el fil-  
trado se saturó con cloruro de sodio y se llevó a  
pH 2, en acetato de etilo como se ha descrito arri-  
20 ba. La fase orgánica se separó y se lavó con salmue-  
ra, secándose después. Las soluciones combinadas de  
acetato de etilo se concentraron a vacío a aproxima-  
damente 80 ml, y la solución se dejó cristalizar.  
La filtración dió el ácido del título (5,93 g) en  
25 forma de agujas finas, de p.f. 180 a 188° (descomp.);

426272

19 JUN



$[\alpha]_D^{20} +19,1^{\circ}$  (c 1,1, dioxano);  $\lambda_{\text{máx}}$  (tampón de fosfato de pH 6) 258 nm ( $\epsilon$  7.200).

Ejemplo 8

5 Preparación del ácido (6R,7R,2'R)-3-hidroximetil-7-(2'-hidroxi-2'-fenilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico

Una suspensión de ácido (6R,7R,2'R)-3-acetoximetil-7-(2'-hidroxi-2'-fenilacetamido)cef-3-em-4-carboxílico, en forma de solvato etanólico (2 g) en agua (30 ml) se llevó a pH 6 con hidróxido de sodio 2N, y la solución resultante se trató con tampón de fosfato 0,4 M de pH 6 (30 ml) y con una pasta congelada de células enteras obtenidas a partir de un cultivo de Rhodotorula rubra (10 g). La suspensión se agitó enérgicamente en un vaso de precipitados durante 16 horas. Se centrifugó la mezcla, y el líquido sobrenadante se decantó y se saturó con cloruro de sodio. La solución se clarificó con tierra de infusorios, y el filtrado se trató con acetato de etilo; después de ello, se enfrió a 5° y se llevó a pH 2 con ácido fosfórico al 25%, con agitación enérgica. Se separó la fase orgánica y se lavó con salmuera, secándose y evaporándose después a un volumen pequeño a vacío. La mezcla se filtró para dar el ácido del título (1,05 g) en forma de placas pequeñas, de p.f. 225 a 230° (descomp.);  $[\alpha]_D^{20} +98^{\circ}$

426272



(c 1,1, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M);  $\lambda_{\text{máx}}$  (tampón de fosfato de pH 6) 260 nm ( $\epsilon$  8.200).

Ejemplo 9

5 Preparación del ácido (6R,7R)-7- $\beta$ -(fur-2-il)-2-metoxi-iminoacetamido-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico (isómero sin)

(a) Una suspensión de ácido (6R,7R)-3-benzoiloximetil-7- $\beta$ -(fur-2-il)-2-metoxiiminoacetamido-  
10 cef-3-em-4-carboxílico (isómero sin-) (101 mg) en agua (3 ml) se llevó a pH 6,8 con bicarbonato de sodio saturado. Se añadieron tampón de fosfato 0,4 M de pH 6 (3 ml) y una pasta congelada de células enteras obtenidas a partir de un cultivo de Rhodotorula rubra (1 g). La suspensión se agitó enérgicamente en un recipiente abierto durante 17 horas a aproximadamente 20°, y luego se centrifugó. El líquido sobrenadante se decantó y se clarificó con tierra de diatomeas, y se liofilizó para dar un sólido amorfo. Este material tenía un comportamiento cromatográfico (Rf 0,17 sobre placas de sílice Merck con cloroformo:metanol:ácido acético = 90:16:5) y un espectro rmp (en D<sub>2</sub>O) similares a los del compuesto preparado en el Ejemplo 5 a partir del derivado acetoximetilado en la posición 3.

25 (b) Una suspensión de ácido (6R,7R)-3-benzoilo-

426272



ximetil-7- $\sqrt{2}$ -(fur-2-il)-2-metoxi-iminoacetamidocef-  
3-em-4-carboxílico (isómero sin-) (208 mg) en agua  
(3 ml) se llevó a pH 6,5 con bicarbonato de sodio  
saturado. Se añadieron tampón de fosfato 0,4 M de  
5 pH 6 (3 ml) y una pasta congelada de células enteras  
obtenidas a partir de un cultivo de Rhodotorula ru-  
bra (1 g), y la mezcla se trató como se ha descri-  
to arriba en (a). El producto final, después de lio-  
filización, tenía un valor Rf y un espectro rmp (D<sub>2</sub>O)  
10 similares a los del material auténtico.

Ejemplo 10

Desacetilación del ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-  
formamidocef-3-em-4-carboxílico

Una suspensión de ácido (6R,7R)-3-acetoxi-  
15 metil-7-formamidocef-3-em-4-carboxílico (12,0 g) en  
agua (150 ml) se llevó a pH 6 con hidróxido de so-  
dio 1 M. La solución resultante se diluyó con tam-  
pón de fosfato 0,4 M de pH 6 (90 ml), y se añadió  
una pasta congelada de células enteras obtenidas a  
20 partir de un cultivo de Rhodotorula rubra (61,5 g).  
La suspensión se agitó enérgicamente durante 19 ho-  
ras. Después de centrifugar la mezcla, decantar el  
líquido sobrenadante y clarificar la solución con  
tierra de infusorios, el producto se caracterizó por  
25 reacción con difenildiazometano, con lo que se pro-

426272

19 50



dujo (6R,7R)-7-formamido-3-hidroxiacetilcef-3-em-4-carboxilato de difenilmetilo (8,44 g) en forma de agujas finas de p.f. 158° (descomp.);  $[\alpha]_D^{22} +16,2^\circ$  (c 1,1, acetona);  $\lambda_{\text{máx}}$  (etanol) 256 nm ( $\epsilon$  7.300).

5 Los espectros infrarrojo y rmp y el análisis elemental estaban de acuerdo con la estructura asignada.

Ejemplo 11

Desacetilación del ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-benzoilamino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico

10

Se disolvió ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-benzoilamino-5-carboxipentanamido)-cef-3-em-4-carboxílico (1 g) en tampón de fosfato 0,1 M de pH 6,0 (100 ml). Se añadieron porciones de 10 ml de esta solución a cada uno de 10 matraces Erlenmeyer de vidrio de 100 ml.

15

Células de Rhodotorula rubra cultivadas en un medio nutriente como se ha descrito en el Ejemplo 1 se lavaron en tampón de fosfato 0,1 M por centrifugación y se suspendieron de nuevo en un volumen igual del mismo tampón. Se añadieron luego porciones de 2,0 ml de esta suspensión a cada uno de los diez matraces que contenían el ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-benzoilamino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico. Los matraces se incubaron

20

25

426272

19 JUN



luego a 25° en un agitador rotativo de sacudidas que tenía una carrera de 5 cm y operaba a 245 revs/min. Se analizaron muestras por cromatografía de capa delgada sobre placas recubiertas de celulosa utilizando un sistema disolvente que comprendía n-propanol acuoso al 70% vol/vol. Una muestra del material de partida se cromatografió como referencia. El compuesto de partida tenía un valor Rf de 0,69 y éste desapareció durante la incubación. Al cabo de 72 horas de incubación no se detectaba en absoluto el ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-benzoilamino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico, y se encontró un compuesto nuevo que tenía un valor Rf de 0,59. Este compuesto se caracterizó por reacción con difenildiazometano, con lo que se produjo el (6R,7R)-7-(D-5-benzoilamino-5-difenilmetoxycarbonilpentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxilato de difenilmetilo (0,70 g) idéntico (por espectroscopía infrarroja) a una muestra auténtica.

20 Ejemplo 12

Preparación del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2, excepto que se empleó un caldo de Rhodotorula graminis CBS 2826 en lugar del caldo de Rhodotorula rubra.

426272

19 JU



El procedimiento para el cultivo de la Rhodotorula graminis fue el mismo que se ha descrito en el Ejemplo 2 para la Rhodotorula rubra.

El análisis cromatográfico (cromatografía de capa delgada como en el Ejemplo 2) demostró que la desacetilación se había completado en 18 horas y que la concentración del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico era de 6,45 mg/ml. El caldo (4 litros) se extrajo como se ha descrito en el Ejemplo 1 para dar el compuesto del título (16,5 g) con una pureza de 73,3% expresada como ácido libre.

#### Ejemplo 13

Preparación del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico utilizando diversas especies del género Rhodotorula

Se sub-cultivaron muestras de cada uno de los organismos utilizados en cultivos sesgados de agar de un medio de cultivo constituido por extracto de levadura/peptona y se incubaron a 25° hasta que se cubrió la superficie. Los cultivos líquidos primarios inoculados con los cultivos sesgados se cultivaron en una máquina de sacudidas durante 48 horas y se utilizaron después para inocular cultivos líquidos secundarios del mismo medio con la adi-

426272

19 JUN



ción de 0,1% peso/vol. de ácido (6R,7R)-3-acetoxime-  
til-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-  
carboxílico para inducir la actividad de la enzima.  
Al cabo de 72 horas de incubación, se utilizaron  
5 los cultivos secundarios para desacetilar el ácido  
(6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipenta-  
namido)-cef-3-em-4-carboxílico.

Muestras que contenían tampón de fosfato  
0,1 M de pH 6,0 (8,5 ml) y ácido (6R,7R)-3-acetoxi-  
10 metil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-  
4-carboxílico (1,0 ml de una solución acuosa al 10%  
peso/vol) se incubaron con porciones de 0,5 ml de  
caldos de levadura preparados como se ha descrito  
arriba. Se ensayaron todas y cada una de las mues-  
15 tras por cromatografía de capa delgada sobre placas  
de celulosa utilizando un sistema disolvente que con-  
tenía n-propanol acuoso al 70% vol./vol., aplicándose  
se en cada placa patrones de referencia de ácido  
(6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipenta-  
20 namido)cef-3-em-4-carboxílico y ácido (6R,7R)-7-(D-  
5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-  
em-4-carboxílico.

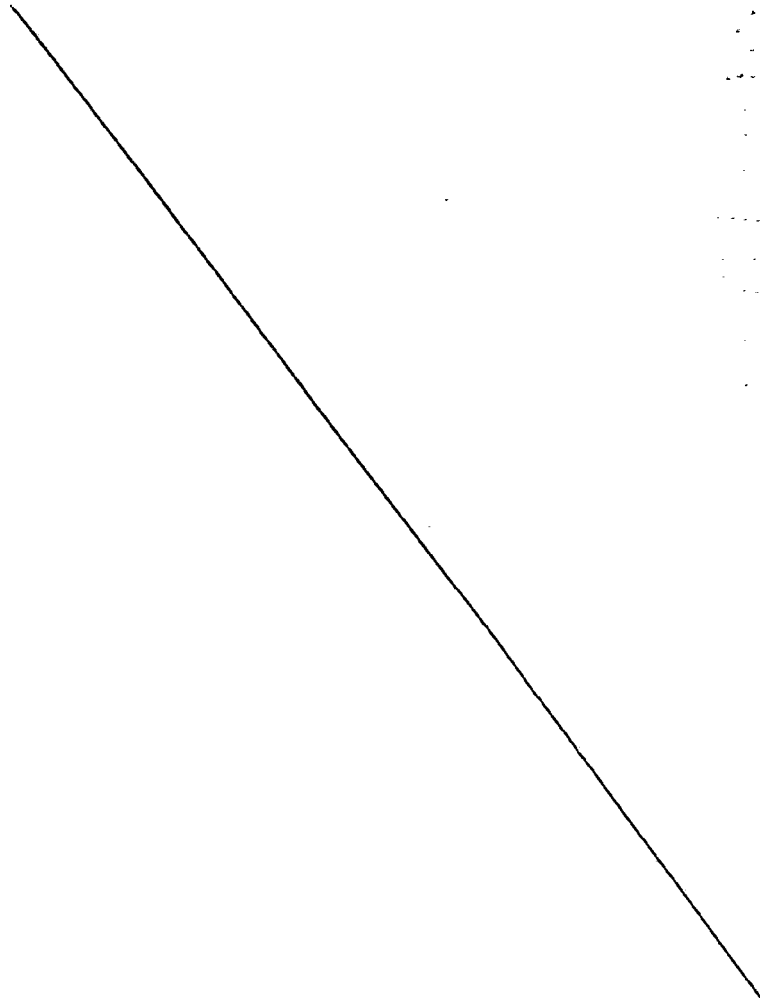
Los resultados de los ensayos correspondien-  
tes al ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-  
25 carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico (Cef. C)

426272

19 JUN.



y al ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico (DAC) después de la incubación durante 24 horas y 72 horas respectivamente, son como sigue:



426272

19 JU



Especie de <u>Rhodotorula</u>	Cepa	Concentración de			
		Cef. C y DAC ( $\mu\text{g/ml}$ )		Al cabo de	
		Al cabo de 24 horas	Al cabo de 72 horas	Cef. C	DAC
R. rubra	CBS 17	530	6960	-	6180
R. aurantiaca	CBS 317	6820	1130	3900	2100
R. glutinis var. dairenensis	CBS 4406	796	6100	-	6840
R. glutinis	CBS 20	-	7300	-	7060
R. lactosa	CBS 5826	6730	1130	5320	1740
R. marina	CBS 2365	7000	1130	612	4580
R. minuta	CBS 319	5460	1590	4360	2700
R. pallida	CBS 320	6320	1130	4260	2320
R. pilimanae	CBS 5804	4700	2720	1750	4520
Testigo - sin levadura	-	6820	976	5120	1280

10.6.74  
H.M.C.

426272

19 JUN. 1984



Ejemplo 14

Preparación del ácido (6R,7R)-7-(4-carboxibutanamido)-  
3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico

Muestras de ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-  
5 7-(4-carboxibutanamido)cef-3-em-4-carboxílico (14 mg)  
en agua (3,5 ml) se mezclaron con tampón de fosfato  
1 M de pH 6,0 (0,5 ml) y agua (0,5 ml) y se inócula-  
ron con 0,5 ml de caldo de Rhodotorula rubra. Se pre-  
pararon también muestras testigo que no contenían  
10 cantidad alguna de caldo de levadura.

Después de incubación durante una noche a  
25° en un agitador rotativo de sacudidas, se analiza-  
ron las muestras por cromatografía de capa delgada  
sobre placas de celulosa. El sistema disolvente es-  
15 taba constituido por n-propanol acuoso al 70% vol./  
vol. y se detectaron las zonas utilizando un densitó-  
metro. En las muestras a las que se había añadido el  
caldo de levadura, el material de partida (Rf 0,62)  
había desaparecido y había sido reemplazado por un  
20 compuesto nuevo que tenía un valor Rf de 0,47. El  
tratamiento con ácido diluido no produjo efecto al-  
guno sobre las muestras testigo, pero en el caso de  
las muestras tratadas con levadura el producto se con-  
virtió en un compuesto que tenía una movilidad aumen-  
25 tada (Rf = 0,50) sobre la placa cromatográfica. Es-

426272

19 JUN.



te comportamiento está de acuerdo con que el producto del tratamiento con levadura sea el compuesto del título.

El producto era también idéntico al producto obtenido por tratamiento del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico con la D-amino-ácido-oxidasa procedente de Trigonopsis variabilis en presencia de azida de sodio.

10 Ejemplo 15

Preparación del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico utilizando células de Rhodotorula rubra incluidas en gel de poliacrilamida.

15 Se preparó un cultivo de Rhodotorula rubra como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se lavaron 10 ml de caldo por centrifugación y se suspendieron de nuevo en un volumen igual de tampón de fosfato 0,1 M de pH 6,0. Esta suspensión se mezcló con monómero  
20 de acrilamida al 40% peso/vol. en tampón (10 ml), N,N-metilen-bisacrilamida al 2,3% peso/vol. en tampón (6 ml), persulfato de amonio (0,0375 g), N,N,N,-N-tetrametiletildiamina (0,048 ml) y tampón de fosfato 0,1 M de pH 6 (34 ml). Se hizo borbotear nitrógeno  
25 a través de la suspensión, la cual se puso des-

426272

19 JUN



pués en un baño de hielo hasta que se completó la polimerización. Una porción del gel resultante se extruyó a través de un tamiz de 841 micras de abertura para producir un tamaño de partícula pequeño. El gel  
5 tamizado se lavó a fondo con tampón hasta que no se apreciaron en absoluto células de levadura en los lavados.

Se mezclaron porciones de 4,0 ml de la suspensión de gel, cada una con tampón de fosfato 0,1 M de pH 6 (5,0 ml) en matraces de vidrio y se inocularon con ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico al 10% peso/vol. (1,0 ml). Después de incubación durante 42 horas a 25° en un agitador rotativo de sacudidas, se  
15 demostró por análisis de cromatografía en capa delgada que la concentración de ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico era 5,86 mg/ml, mientras que la concentración del ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico había  
20 descendido a 0,78 mg/ml. Las muestras testigo con gel de poliacrilamida que no tenían cantidad alguna de células de levadura incluidas, tenían concentraciones de ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico de sólo 1,2 mg/ml,  
25

426272

19 JUN. 1974



y concentraciones residuales de ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico de 5,48 mg/ml.

Ejemplo 16

- 5 Preparación del ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico utilizando células de Rhodotorula rubra incluidas en fibras de triacetato de celulosa

Se cultivó en una máquina de sacudidas Rho-  
10 dotorula rubra a 25° durante 72 horas en presencia de ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico al 0,1% peso/vol. Las células procedentes de 40 ml del caldo total se recogieron, se lavaron por centrifugación y  
15 se suspendieron de nuevo en agua (7 ml). Se preparó una emulsión a partir de esta suspensión por adición de 2 ml de la suspensión a 10 ml de una solución al 5% peso/vol. de triacetato de celulosa en cloruro de metileno y agitación rápida de la mezcla durante 2  
20 minutos utilizando un agitador mecánico. La emulsión resultante se extruyó mediante una aguja hipodérmica de acero inoxidable (Everett Star, tamaño 0) en el remolino formado agitando rápidamente tolueno con ayuda de un agitador magnético. Se extendió un filamen-  
25 to continuo y se recogió alrededor del agitador. El

426272



filamento se recuperó, se lavó con agua y se guardó en agua a 4°. El peso total de fibra seca recuperado fue de 1,5 g.

5 Muestras de 0,4 g de la fibra se secaron por prensado sobre papel de filtro y se pusieron luego en una mezcla de tampón de fosfato 0,1 M de pH 6 (9 ml) y ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico al 10% peso/vol. (1,0 ml). Después de incubación en una máquina rotativa de sacudidas a 25°, se tomaron muestras para ensayo cromatográfico. Se demostró que se produjo el ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico a un ritmo de 2,75 mg/g de fibra/hora.

15 La fibra se recuperó del sistema de incubación y se lavó en agua. La misma fibra se volvió a utilizar después para desacilar el ácido (6R,7R)-3-acetoximetil-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)cef-3-em-4-carboxílico. Se obtuvo una velocidad de producción de ácido (6R,7R)-7-(D-5-amino-5-carboxipentanamido)-3-hidroximetilcef-3-em-4-carboxílico de 4,15 mg/g de fibra/hora con la fibra reutilizada.

25 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 14 de Mayo de 1973, bajo el Nº 22799/73 (provisional), y el 6 de Mayo de

426272

19 JU



1974 (Completa), se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

#### REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15 1ª.- Un procedimiento para la conversión de un ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico en su análogo de 3-hidroximetilo por hidrólisis, caracterizado por el hecho de que la hidrólisis es catalizada por una esterasa producida por cultivo de un microorganismo de tipo levadura o un mutante del mismo del género Rhodotorula.

20 2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª en el que dicho ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico es un ácido 3-acetoximetilcef-3-em-4-carboxílico.

25 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la

10.6.74  
H.M.C.

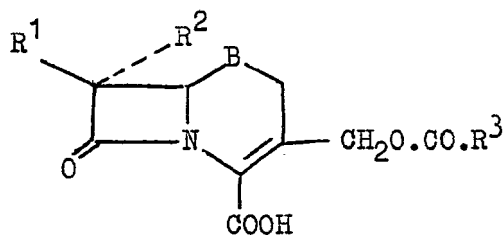
426272

19 JUN.



reivindicación 1ª en el que dicho ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico es un compuesto de la fórmula general

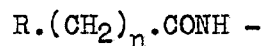
5



10 en la que R<sup>1</sup> es un grupo amino o un grupo amino bloqueado; R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alcohilo inferior, alcoxi inferior, alcoholitio inferior o alcanóilo inferior; R<sup>3</sup>.CO es un grupo acilo carboxílico que contiene de 2 a 20 átomos de carbono; y B  
15 es >S ó >S → O.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3ª en el que R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno y B es >S.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3ª o la reivindicación 4ª en el que R<sup>1</sup>  
20 se selecciona de entre D-5-amino-5-carboxipentanamido y derivados protegidos en N del mismo; 4-carboxibutanamido; formamido; un grupo de fórmula



25 en el que R es un grupo arilo carbocíclico o hetero-

426272

19 JUN

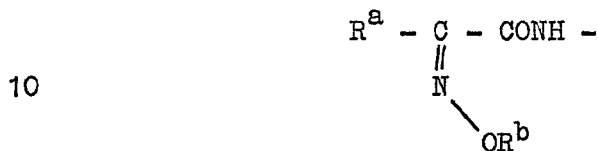


cíclico o un grupo ariloxi, ariltio, aril-alcoxi inferior o aril-alcohiltio inferior y  $n$  es un número entero comprendido entre 1 y 4; un grupo de fórmula



5

en la que  $R^a$  es un grupo arilo y X es amino, amino protegido, carboxi, carbalcoxi o hidroxilo; y un grupo de fórmula



10

en la que  $R^a$  es como se ha definido arriba y  $R^b$  es un átomo de hidrógeno o un grupo acilo, alcoholo inferior, cicloalcoholo, arilo o aril-alcoholo inferior.

15

6<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5<sup>a</sup> en el que  $R^1$  se selecciona de entre D-5-benzoilamino-5-carboxipentanamido, tienilacetamido, 2-hidroxi-2-fenilacetamido, 2-t-butoxicarbonilamino-2-fenilacetamido y sin-2-furil-2-metoxi-iminoacetamido.

20

7<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> en el que  $R^3.CO-$  es un grupo acilo seleccionado de entre alcanóilo inferior, alquenoóilo inferior, aril-alcanoóilo

25

*Bej*

426272

19 JUN.



inferior y anólo.

8<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7<sup>a</sup> en el que R<sup>3</sup>.CO- es crotonóilo o benzoílo.

5 9<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> en el que R<sup>3</sup>.CO- es acetilo.

10 10<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2<sup>a</sup> en el que el ácido 3-acetoximetilcef-3-em-4-carboxílico es la cefalosporina C.

11<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10<sup>a</sup> en el que el caldo total de una fermentación de cefalosporina C se trata con la esterasa.

15 12<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico se pone en contacto con una fuente de esterasa que comprende las células integrales obtenidas a partir de un  
20 caldo cultivado del microorganismo de tipo levadura.

13<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12<sup>a</sup> en el que las células integrales están inmovilizadas en el seno o en la superficie de una matriz inerte.

25 14<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cual-

10.6.74  
H.M.C.

426272

19 JUN.



5 cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª en el que el ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico se pone en contacto con esterasa exenta de células inmobilizada en el seno o en la superficie de una matriz inerte.

15ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13ª o la reivindicación 14ª en el que la matriz inerte comprende gel de poliacrilamida o triacetato de celulosa.

10 16ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª en el que el ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico se trata directamente con un caldo cultivado del microorganismo de tipo levadura.

15 17ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se utiliza un microorganismo o un mutante del mismo de la especie Rhodotorula rubra.

20 18ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17ª en el que el microorganismo es Rhodotorula rubra CBS 6469.

19ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17ª en el que el microorganismo es Rhodotorula rubra CBS 17.

25 20ª.- Un procedimiento de acuerdo con cual-

426272

19 JUN.



quiera de las reivindicaciones 1ª a 16ª en el que se utiliza un microorganismo o un mutante del mismo de cualquiera de las especies Rhodotorula glutinis, Rhodotorula glutinis var. dairenensis, o Rhodotorula graminis.

21ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20ª en el que el microorganismo es Rhodotorula glutinis CBS 20.

22ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20ª en el que el microorganismo es Rhodotorula glutinis var. dairenensis CBS 4406.

23ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20ª en el que el microorganismo es Rhodotorula graminis CBS 2826.

24ª.- Un procedimiento para la conversión de un ácido 3-aciloximetilcef-3-em-4-carboxílico en su análogo de 3-hidroximetilo.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cincuenta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 JUN. 1974

P.A.

Fernando de Cizaburu  
Per Foz

10.6.74  
H.M.C.

129