

427544

CONCEDIDA

M. CIA COFD

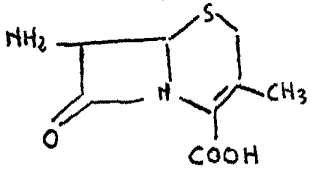
PATENTE DE INTRODUCCION
en ESPAÑA
por DIEZ años

A favor de la firma ANTIBIOTICOS, S.A., de nacionalidad española, domiciliada en Madrid, calle Bravo Murillo, 38, por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR ACIDO 7-AMINO DESACETOXI CEFALOSPORANICO".

MEMORIA DESCRIPTIVA

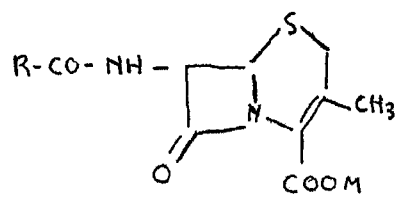
El ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico representado por la fórmula general

5.



se produce según un proceso en el cual un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico representado por la fórmula general,

10.



15.

en donde R es un grupo bencilo o feroximetilo, y M es un átomo de metal alcalino capaz de formar una sal soluble en agua, se trata con un filtrado del cultivo de una cepa productora de enzimas que pertenecen al género Bacillus, la cual puede romper el enlace amida de dicho compuesto, siendo dicha cepa el Bacillus megaterium B-400 PERM-P Nº 748, o se trata en un medio acuoso con un pro-

20.

BAD ORIGINAL

parado de enzimas obtenido de dicha cepa productora.

25. Esta invención se refiere a un proceso para producir ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico (en lo sucesivo referido como "7-ADCA") por desacilación enzimática de un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico. Más particularmente, la invención se refiere a un proceso para elaborar 7-ADCA, es decir, 7-amino-3-metil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico, con un preparado de enzimas derivado del Bacillus megaterium.

30. Hasta ahora, el 7-ADCA se ha producido de acuerdo con procesos en los que la cefalosporina C era reducida catalíticamente en presencia de carbono paladio para obtener ácido 3-metil-7 (amino-adipoylamido)- Δ^3 -cefem-4 carboxílico, el cual era luego desacilado por hidrólisis. (Patente de los Estados Unidos 3.124.576 (1.964)); un proceso en el cual el ácido 7-aminocefalosporánico es desacilado por reducción catalítica (la misma patente de Estados Unidos mencionada anteriormente); y un proceso en el cual el 3-metil-7-fenoxi-acetamida- Δ^3 -cefem-4-carboxilato derivado de la fenoximetil penicilina se trata con PCl_5 en un disolvente orgánico anhidro en presencia de piridina, y el cloruro de imida resultante se trata con un alcohol para formar un éster de imida, el cual se somete después a hidrólisis. (Patentes Belgas Nº 717.741 (1.969) y 737.761 (1.970)).

45. Todos los procesos antes mencionados, sin embargo, son procesos de descomposición química, y no se ha propuesto ningún proceso para producir 7-ADCA enzimáticamente.

50. Ante esta situación, los presentes inventores siguieron estudios extensos con objeto de producir enzimáticamente 7-ADCA con ventajas e investigaron varias cepas capaces de desacilar el ácido 3-metil-7-fenoxiacetamido- Δ^3 -cefem-4-carboxílico, o 3-metil-7-fenilacetamido- Δ^3 -cefem-4-carboxílico. Como resultado, los inventores han encontrado que la cepa E-400 que pertenece al género Bacillus, que ha sido aislada del suelo, produce una enzima capaz de descomponer los enlaces amídicos del ácido 3-metil-7-fenoxiacetamido- Δ^3 -cefem-4-carboxílico y ácido 3-metil-7-fenilacetamido- Δ^3 -cefem-4-carboxílico. Los inventores han encontrado que cuando el ácido 3-metil-7-fenilacetamido- Δ^3 -cefem-4-carboxílico es tratado

60.

65. con un preparado de enzimas derivado de la cepa antes mencionada, se produce un compuesto que es inactivo en si mismo, pero puede producirse cuantitativamente 7ADCA con ayuda del cloruro de fenilacetilo y que cuando el ácido 3-metil-7-fenoxiacetamida- Δ^2 -cefem-4-carboxilico se trata con el preparado de enzimas antes mencionado, también puede producirse el ácido 7-amino-3-metil- Δ^2 -cefem-4-carboxilico.
- 70.

Las propiedades de la cepa antes mencionada, B-400, son las siguientes:

- I. Características morfológicas (cultivo en agar común inclinado a 30° C durante 18 a 24 horas):
75. (1) Bacilos, principalmente en largas cadenas, extremos redondos.
(2) Tamaño: 1,2 a 1,5 por 2,0 a 3,5 micras.
(3) Sin membrana
(4) Móvil con flagelos (peritricos).
80. (5) Gram positivo
(6) Esporas (agar de soja a 30° C 5 días):
Tamaño: 1,0 a 1,2 por 1,5 a 2,0 micras.
Forma oval.
Posición central o paracentral.
85. Esporangios sin engrosamientos manifiestos.
- II. Comportamiento en diferentes medios de cultivo:
- (1) Placas de agar común sembradas en ostria (30° C 24 horas):
90. Crecimiento bueno, circular, convexo, no invasor, blanco o amarillo pálido, brillante, suave, húmedo, translúcido; sin cambio en color del medio.
- (2) Tubos inclinados de agar común (30° C 24 horas):
95. Crecimiento bueno, superficie suave, no invasor, brillante, húmedo. Colonias blanco lechosas, translúcidas, sin cambio en color del medio.
- (3) Caldo (30° C 2 días):
- Crecimiento bueno, turbidez uniforme con sedimento; no forma velo.
100. (4) Gelatina en picadura (30° C, 20 días)
- Crecimiento de superficie al centro a lo largo de la picadura.
Sin licuefacción de la gelatina.

105. (5) Leche tornasolada (30°C, 20 días):
No la peptoniza; reduce el tornasol; el medio de cultivo toma color pardo amarillento.
- (6) Tubos inclinados de agar soja (30°C, 24 horas):
Buen crecimiento, blanco a blanco amarillento, superficie blanda y suave. Buena formación de esporas.
110. (7) Tubos inclinados de agar nitrato-glucosa (30°C, 3 días):
Crecimiento escaso.
115. (8) Tubos inclinados de agar tirosina (30°C, 3 días):
Buen crecimiento el medio pardo.
- (9) Patata (30°C, 5 días):
Buen crecimiento; colonias de rosado a pardo, superficie blanda y húmeda, convexa y brillante; el medio se hace pardo pasado el tercer día.
120. **III. Propiedades fisiológicas:**
- (1) Condiciones de crecimiento óptimas:
Aeróbico, pH 7,0 a 8,0 y 28° a 35°C.
- (2) Condiciones de crecimiento límites:
Aeróbico, pH 5 a 10 y 7° a 45°C.
125. (3) Resistencia a los ácidos:
Baja, sin crecimiento por debajo de pH 5,0.
- (4) Necesidades de oxígeno:
Aeróbica, sin crecimiento en caldo glucosado en condiciones anaeróbicas.
130. (5) No produce indol.
- (6) Produce sulfuro de hidrógeno.
- (7) Reacción de desnitrificación:
Sin formación de gas.
135. (8) Reduce los nitratos.
- (9) Formación catalasa:
Positiva.
- (10) Formación ureasa:
Positiva.
140. (11) El almidón es hidrolizado.
- (12) Utilizan los citratos (en los medios de Koser y Christensen).
- (13) Reduce el tornasol.
- (14) Reduce el azul de metileno.
145. (15) Forma pigmento hidrosoluble en el medio de patata.

IV. Fermentabilidad de los hidratos de carbono:

	<u>Hidratos de carbono</u>	<u>Formación de ácido</u>	<u>Formación gas</u>
	Arabinosa	-	-
	Xilosa	-	-
150.	Glucosa	+	-
	Manosa	+	-
	Fructosa	+	-
	Galactosa	-	-
	Ribosa	+	-
155.	Ramnosa	+	-
	Maltosa	+	-
	Sacarosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Trehalosa	+	-
160.	Rafinosa	-	-
	Celobiosa	+	-
	Sorbitol	-	-
	Manitol	+	-
	Inositol	-	-
165.	Glicerina	+	-
	Glucitol	-	-
	Salicina	-	-
	Inulina	-	-
	Almidón	+	-

170.

Quando se examinó la posición taxonómica de la cepa B-400 que tiene las propiedades antes mencionadas, con referencia al BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, Seventh Edition, los presentes inventores identificaron que la cepa perteneció al género Bacillus megaterium. Consecuentemente, los inventores compararon la cepa B-400 con el cultivo tipo enviado desde la AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) para reconocer que la cepa era análoga al Bacillus megaterium var. penicillalyticum ATCC 14945, pero era diferente de aquella en los siguientes puntos:

175.

180.

	<u>Bacillus megaterium</u> B-400	<u>Bacillus megaterium</u> var. <u>Penicillalyticum</u> ATCC 14945
Licuefacción de gelatina	Licuefacción escasa	Licuefacción gradual
Leche tornasolada	Reduce el pigmento	El pigmento se hace alcalino y no se reduce.
Tubos inclinados de agar-patata	Forma pigmento par- do hidrosoluble	No forma pigmento
Formación de ácido a partir de la manosa	Forma ácido	No forma ácido

185.

De lo anterior, los inventores dedujeron que la cepa B-400 es una cepa nueva de Bacillus megaterium. La cepa B-400 se ha depositado con el número "FERMPN 748" en el Instituto de Investigación de Industria de Microorganismos, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, del Japón.

190.

Así, la presente invención es un proceso para producir 7-ADCA que comprende la desacilación de una sal hidrosoluble de un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico, por tratamiento en medio acuoso, con un preparado de enzimas derivado del cultivo de una cepa desacilante productora de enzimas que pertenece al género Bacillus. Este proceso es de alto rendimiento en 7-ADCA, pero no puede decirse que sea un proceso comercialmente ventajoso por la razón de que el enzima desacilante debe ser extraído del cultivo de la cepa productora de enzimas; la concentración del 7-ADCA resultante es baja de modo que la separación del 7-ADCA hidrosoluble del líquido de reacción es costosa; y la recuperación del enzima

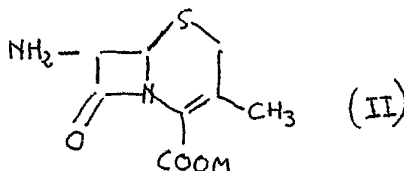
195.

200.

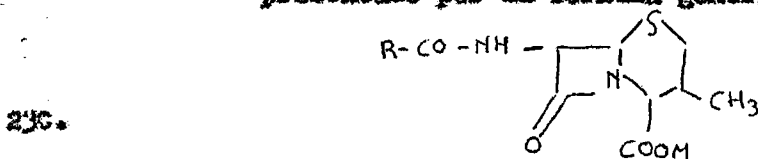
desacilante es prácticamente imposible.

205. En vista de lo anterior, los presentes inventores han hecho más estudios sobre procesos en los cuales se permite que reaccione el enzima desacilante en la fase sólida. Como resultado, los inventores han descubierto que cuando se mezcla con un filtrado de cultivo de la cepa desacilante productora de enzimas, un determinado soporte, éste absorbe la enzima sin inactivarla y no la libera por lavado con agua y que cuando una
210. solución acuosa de una sal hidrosoluble de ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico circula a través de una columna de dicho soporte, el 7-ADCA sale en concentración sumamente alta y además el enzima descompone continuamente el ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico por lo que puede utilizarse con gran rendimiento.
215.

La presente invención se ha logrado sobre la base del hallazgo antes mencionado y es un proceso para producir 7-ADCA, representado por la fórmula general (II),
220.



225. caracterizado porque un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico (en lo sucesivo referido como "Ce (I)" representado por la fórmula general (I),



230. en la que R es un grupo bencilo o fenoximetilo y M es un átomo de un metal alcalino capaz de formar una sal hidrosoluble, se trata con un filtrado de cultivo de una cepa productora de enzimas que pertenece al género Bacillus, la cual puede descomponer el enlace amida de dicho compuesto Ce(I), o se trata en un medio acuoso
235.

con un preparado de enzimas derivado de dicha cepa productora de enzimas.

240.

La presente invención abarca además un proceso para producir el 7-ADCA, caracterizado porque el antes mencionado enzima desacilante del Ce(I) es adsorbido en un soporte que no inactiva dicho enzima, se añade a dicho soporte una solución acuosa de Ce(I) para desacilarlo, y se recupera el 7-ADCA del líquido de la reacción.

245.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso nuevo para producir enzimáticamente un intermediario para antibióticos del grupo de las cefalosporinas, los cuales son muy útiles como preparados químico-terapéuticos.

250.

Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso comercialmente ventajoso para producir 7-ADCA, en el cual la antes mencionada reacción enzimática se efectúa continuamente en la fase sólida, adsorbiendo el enzima desacilante sobre un soporte para que así se pueda utilizar repetidamente sin que sea inactivado.

255.

La cepa productora de enzimas Ce(I)-desacilantes, utilizada en la presente invención es, por ejemplo, el Bacillus megaterium B-400 FERM-P N° 748.

260.

El enzima capaz de descomponer el enlace amida del Ce(I), que se utiliza en la presente invención, se obtiene cultivando aeróbicamente el Bacillus megaterium B-400 FERM-P N° 748, de 25° a 37° C durante 12 a 60 horas en un medio que se utiliza ordinariamente, para el cultivo de las bacterias, es decir, un medio nutriente que contenga cantidades apropiadas de una fuente de nitrógeno, como por ejemplo peptona, extracto de carne, corn steep liquor, extracto de levadura, levadura seca, hidrolizado de proteínas de soja o subproductos de su lixiviación; una fuente de carbono como melazas, glucosa o glicerina; y sales inorgánicas; y en algunos casos otras materias activadoras del crecimiento. En general, se efectúa el cultivo en medio líquido aireado por agitación.

265.

270.

275.

El enzima antes mencionado es ordinariamente, un exoenzima y está presente en el filtrado de cultivos libres de células. En la reacción de enzimas, por consiguiente, se utiliza el enzima en forma de un filtrado de

280. cultivo o de un preparado de enzimas, preparado a partir del cultivo filtrado. Dicha preparación de enzimas se obtiene sometiendo el enzima a un método conocido de purificación. Por ejemplo, se obtiene concentrando o sin concentrar el filtrado del cultivo y precipitando el enzima por semisaturación, o saturación, con una sal soluble como por ejemplo sulfato amónico o cloruro sódico o precipitando la misma por adición de un disolvente orgánico hidrofílico, como metanol, etanol o acetona. El precipitado se disuelve en agua, y la solución resultante se dializa con una membrana semipermeable, mediante la cual se pueden eliminar las impurezas de bajo peso molecular. Otra posibilidad es, aprovechando la diferencia de afinidad de adsorción de un adsorbente o agente filtrante de gel, se pueden eliminar eficazmente las impurezas de bajo peso molecular, las sustancias coloreadas, las proteínas y los materiales análogos en líquido de cultivo, según un procedimiento ordinario como por ejemplo cromatografía de adsorción, la cromatografía de cambio de iones o la filtración de gel. La solución de enzimas obtenida de acuerdo con los procedimientos antes mencionados se puede someter a concentración a presión reducida, secado por refrigeración u operaciones semejantes para obtener un preparado enzimático uniforme en forma sólida o se puede utilizar como está para el tratamiento del $Ca(I)$. En caso que se requiera que la preparación de enzima sea más purificada, se puede adoptar cualquiera de las técnicas ordinarias adoptadas en la purificación de proteínas y enzimas en los cuales se utiliza, por ejemplo, un adsorbente, un agente filtrante de de gel o producto análogo.
- 285.
- 290.
- 295.
- 300.
- 305.

310. Ordinariamente, la reacción de enzimas se lleva a cabo de tal manera que el $Ca(I)$ se disuelve en agua o en una solución amortiguadora y luego se trata con la antes mencionada preparación de enzimas. El $Ca(I)$ se lleva, en general, a la forma de sal sódica o potásica hidrosoluble y se utiliza en una concentración entre 0,1 y 20 mg/ml, preferiblemente de unos 2 a 5 mg/ml. El pH del líquido de reacción se mantiene preferiblemente entre 7 y 8. La temperatura de reacción es de 30 a 45° C, preferiblemente de unos 35 a 45° C, con lo cual se pueden obtener resultados favorables. El tiempo de la reacción varía, dependiendo
- 315.

320. do de las condiciones de la reacción, pero generalmente es de unas 5 a 30 horas, y la reacción se puede terminar en una etapa apropiada, buscando el momento en el cual el rendimiento del 7-ADCA, representado por la fórmula general (II) llega al máximo.
325. La clase de soporte que se utiliza en la presente invención varía en función de la cepa productora de enzimas Ce(I)-desacilantes que se utilice. Sin embargo, es necesario seleccionar el soporte en función de los puntos que pueden absorber el enzima desacilante sin inactivarlo; no debe liberar el enzima incluso al ser lavado con agua o soluciones análogas; no debe tener influencia perjudicial sobre la reacción enzimática de descomposición de Ce(I); y debe adsorber fácilmente el 7-ADCA resultante. Por ejemplo, cuando un
330. soporte inorgánico como la celita, el yeso, la arcilla activa, el caolín, el carbón activo o silicagel, un cambiador de iones como la celulosa CM o el cefadex G-25, o una resina cambiadora de iones como la amberlita
335. CG-50, o el Dowex-50 se utiliza como soporte, el enzima Ce(I)-desacilante producido por el Bacillus megaterium B-400 se adsorbe bien sin que sea inactivado, pero cuando se utiliza alúmina, polvo de celulosa, celulosa DEAE, cefadex-25 DEAE o resina cambiadora de aniones, el enzima desacilante se adsorbe escasamente, o se inactiva, incluso cuando ha sido adsorbida.
345. Al adsorber el enzima Ce(I) desacilante en el soporte, es deseable que el pH del filtrado del cultivo de la cepa productora de enzimas Ce(I) desacilantes sea ajustado previamente a un pH en el que el enzima desacilante sea estable. Por ejemplo, al adsorber un
350. enzima desacilante producido por Bacillus megaterium sobre celita, el pH del filtrado del cultivo de la misma, se ajusta en general a pH 6 - 8. Sin embargo, sobre todo cuando se emplea un cambiador de iones o una
355. resina cambiadora de iones que son influenciados por la fuerza iónica, el poder de adsorción o el grado de desactivación del enzima desacilante, está en función del pH, por lo que el soporte deberá utilizarse de acuerdo con estas consideraciones.

360. La operación de adsorber el enzima desacilante en el soporte, puede realizarse de acuerdo con cualquier procedimiento en forma discontinua o del tipo de adsorción en columna. La cantidad de soporte que se emplea varía, según la cantidad y título de enzima del filtrado del cultivo de la cepa desacilante productora de enzimas y del índice de adsorción del enzima desacilante sobre el soporte. Al adsorber el enzima, según procedimiento discontinuo, la cantidad empleada de soporte puede ser de unos 5 a 15 p/v % sobre la cantidad del filtrado del cultivo. En este caso, se agita una mezcla del filtrado de cultivo y del soporte y luego se separa el soporte y se lava con agua en tanto que en el caso de adsorción en columnas, el soporte empaquetado en una columna es humedecido con agua o con una solución amortiguadora ajustada a un pH estable para el enzima desacilante, el filtrado de cultivo pasa a través de la columna y luego la columna se lava con agua con lo cual se puede obtener un soporte que ha adsorbido el enzima desacilante.
- 365.
- 370.
- 375.
380. Cuando el soporte así obtenido que ha adsorbido al enzima desacilante se seca, el enzima desacilante tiende a desactivarse. Por ello, es deseable utilizar el soporte en la reacción Ce(I)-desacilante, en estado húmedo antes de que se seque. El Ce(I) que se utiliza en la presente invención puede prepararse según un proceso conocido, es decir un proceso en el cual un ester de sulfóxido de penicilina esté sujeto a expansión de anillo (Patente de los EE.UU. 3.275.626, Patente Belga 696.026, Publicación de Patente Holandesa 6.806.532, Patente Belga 745.845, Patente Británica 1.204.394 y Patentes Belgas 747.118, 747.119 y 747.120), y el ester del ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico resultante se desesterifica, o un proceso en el cual se separa el grupo acetoxi acetamido del ácido 7-acilamino cefalosporánico (Patente de EE.UU. 3.275.626). Después, se lleva a cabo la reacción enzimática Ce(I)-desacilante en solución, para lo que se emplea el Ce(I) en general en la forma de sal de un me-
- 385.
- 390.
- 395.

tal alcalino hidrosoluble, es decir, una sal sódica o potásica.

400 A continuación, se trata una solución acuosa de Ce(I) con el soporte adsorbido con enzimas desacilantes. En este caso, es deseable que la solución sea previamente tamponada con una solución que tenga el mismo pH que el propio del enzima desacilante. La reacción enzimática anterior es efectuada, en general, por el
405 procedimiento de columna, debido a que la reacción se efectúa en continuo. La concentración de Ce(I) que se añade varía, fundamentalmente en función del título del enzima, es decir, de la capacidad desacilante del Ce(I) del enzima desacilante y del caudal, y debe ser elegida de forma que la cantidad de Ce(I) sin reacción que ha quedado en el líquido de la reacción que fluye sea lo menor
410 posible. En general, la concentración de Ce(I) es de 0,1 a 2,0 P/V%, preferiblemente de unos 0,5 a 1,0 P/V%, pero no es necesario decir que la concentración varía en función de la clase de soporte que se emplea. La reacción antes mencionada, por supuesto se efectúa a pH y temperatura apropiadas, preferiblemente el pH y temperatura óptimos del enzima desacilante de Ce(I). Sin embargo, es deseable que se ensayen diversas condiciones de reacción, de modo que el 7-ADCA formado en el líquido de la reacción fluya en una concentración lo más alta posible. El tiempo de la reacción
415 puede variar cuando se aumenta o disminuye la cantidad de solución acuosa de Ce(I) que se añade. En general, la reacción es completa antes de que la solución acuosa de Ce(I) haya pasado a través de la totalidad de la capa de soporte de la columna. No obstante, en caso de que la proporción Ce(I)-desacilación haya sido baja y una gran cantidad de Ce(I) haya quedado en el líquido de la reacción, éste se añade de nuevo como está a la misma columna o a otra columna que contenga soporte en el que se haya absorbido el enzima desacilante con lo cual se puede obtener un líquido de reacción con alto rendimiento en Ce(I)-desacilación.
420
425

430 En el caso de la reacción enzimática antes mencionada quiera llevarse a cabo en continuo, basta con que la solución acuosa del Ce(I) sea añadida continuamente al soporte adsorbente cargado con enzima desacilante. Sin embargo, la relación Ce(I) desacilación tiende a disminuir gradualmente día a día, por la aparición de bacterias o cosas semejantes. Se puede minimizar el efecto perjudicial debido a la contaminación, añadiendo tolueno
435

440. en la parte superior de la columna o en el sustrato. En el presente proceso, la capa de soporte se puede utilizar durante más de diez días, de modo que se puede recuperar el 7-ADCA con alto rendimiento y producirse a bajo costo. Consecuentemente, el presente proceso puede decirse que es sumamente ventajoso para producir 7-ADCA mediante desacilación enzimática del Co(I).

445. La recuperación del 7-ADCA del líquido de la reacción así obtenido puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido. Por ejemplo, se ajusta el líquido de la reacción a un pH de aproximadamente 2, y se lava con un disolvente orgánico hidrofóbico como por ejemplo el acetato de etilo, acetato de butilo o metil-isobutil cetona para eliminar el Co(I) sin reaccionar y luego se concentra la capa acuosa y se ajusta en frío a un pH de aproximadamente 3,7 para precipitar el 7-ADCA isoelectricamente. Otro procedimiento consiste en ajustar el líquido de la reacción en un pH de aproximadamente 3,7 concentrado y luego enfriado, y lavar el precipitado resultante con acetona para eliminar el Co(I) sin reaccionar y ácido carboxílico que aparece como subproducto. De la forma anterior, se puede recuperar el 7-ADCA.

450. Método de medida de la actividad del enzima adsorbido:

455. Un soporte que halla adsorbido el enzima desacilante se pesa en un tubo de ensayo en forma de L. Al tubo de ensayo se añaden 4,5 ml de una solución amortiguadora de fosfatos M 0,1 (pH 7,5), y se agita el tubo de ensayo durante 10 minutos en un agitador termotatizado tipo Monod mantenido a 37°C. A continuación, 0,5 ml (10mg/ml en ácido libre) de una solución acuosa de sal sódica de ácido 7-fenilacetamido-desacetoxi-cefalosporánico se añade y la mezcla resultante se hace reaccionar durante 30 minutos. Después de la reacción se enfría de inmediato el líquido de la reacción y se valora el 7-ADCA según el método TNBS en el líquido de reacción libre de soporte. Un enzima que forme 100% /ml de 7-ADCA se considera que tiene un título de cien unidades (U).

460.

465.

470.

475.

Métodos de determinación del 7-ADCA:

(1) Método de determinación 1:

480. El líquido de la reacción se somete a un ensayo microbiológico (37°C. 16 horas), según el método de disco de papel o método de cilindros utilizando Bacillus subtilis PCI-219 como cepa de ensayo, y se mide el diámetro del halo de inhibición. Con una curva patrón de Ce(I) se calcula la cantidad de Ce(I), y la diferencia entre el Ce(I) inicial y el Ce(I) residual se representa por un porcentaje sobre Ce(I) inicial. Este porcentaje es la proporción de descomposición del Ce(I) inicial.

485.

(2) Método de determinación 2:

490. Se ajusta una cantidad conocida de líquido de reacción a pH 2,5, con ácido clorhídrico 1N, lavado tres veces con una mitad de su volumen de acetato de butilo y ajustado a pH 7,5 con hidróxido sódico 1 N. A continuación se trata una cantidad conocida del líquido de reacción así tratada con un cloruro de ácido que corresponde al ácido existente en la cadena lateral del Ce(I) de arranque, y luego se somete al ensayo microbiológico del método de determinación 1. De la cantidad del Ce(I) resultante se calcula la cantidad de 7-ADCA que se expresa por un porcentaje. Este porcentaje es el rendimiento de 7-ADCA.

495.

500.

(3) Método de determinación 3. método TNBS:

505. A 1 ml de una muestra se añaden 2 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0,3 M (pH 8,0) y 2 ml de una solución de TNBS al 0,1 % y la mezcla resultante se hace reaccionar en la oscuridad a 30°C durante 90 minutos.

510.

Después de enfriarse se añade al líquido de reacción 1 ml de ácido clorhídrico 6 N, se mide su absorbancia a 395 mμ, y se calcula la cantidad de 7-ADCA a partir de la curva normal del 7-ADCA. El presente proceso se ilustra con detalle después, con referencia a los ejemplos, pero las cepas, las condiciones de la reacción y las operaciones de la reacción no se limitan a las que se presentan en los ejemplos si no que pueden variarse apropiadamente.

515.

Ejemplo 1:

Preparación del enzima:

20 litros de un medio de cultivo líquido (pH 7,0) conteniendo 1% de polipeptona, 1% de extracto de levadura y 0,5% de cloruro sódico, se colocó un fermentador de 30 litros y se esterilizó durante 20 minutos con vapor a 120° C. El inóculo, 200 ml de un caldo de cultivo de Bacillus megaterium B-400 FERM-P N° 748, que se habían cultivado a 30°C durante 24 horas en un medio de cultivo de la misma composición que el anterior, se transfirieron en condiciones estériles al medio de cultivo mencionado con anterioridad y se fermentaron a 30°C, durante 48 horas, con aireación (20 litros de aire por minuto) y agitación (300 r.p.m.). Después de la fermentación, se eliminaron las células mediante una centrifuga Westfalia, para obtener 17,4 litros de caldo filtrado.

520.

525.

530.

Ejemplo 2:

El caldo filtrado obtenido en el ejemplo 1, se concentró a 1/3 a temperatura de 30 a 35°C, y el concentrado se cargó con sulfato de amonio hasta que se obtuvo una concentración del 80% de la saturación. Se disolvió el precipitado depositado en agua destilada y se desaló por empleo de una columna de Sephadex G-25, y la solución desalada se secó por liofilización para obtener 24,3 gr de un producto onzimático standard.

535.

540.

Ejemplo 3:

Preparación de enzimas:

20 litros de un medio de cultivo (pH 7,0) conteniendo 0,5% de glucosa, 0,3 de glicorina, 1,0% de extracto de carne y 1,0% de polipeptona se cargaron en un fermentador de 30 litros, y se esterilizó durante 20 minutos con vapor a 120°C. El inóculo, 200 ml del medio de cultivo de Bacillus megaterium B-400 FERM-P N° 748, el cual se había cultivado a 30°C, durante 24 horas en un medio de cultivo de la misma composición que el anterior, se transfirió en condiciones estériles al medio de cultivo anterior y se fermentó a 30°C durante 72 horas con aireación (20 litros por minuto), y agitación (300 r.p.m.). Después de la fermentación, se eliminaron

545.

550.

555. las células mediante una centrífuga Westfalia, y el filtrado se concentró a 1/3 a temperatura de 30 a 35°C. El concentrado se cargó con acetona hasta que la cantidad de acetona llegó a ser el 60%, el precipitado depositado se retiró por filtración y luego se secó para obtener 25,5 gr de productos de enzimas standard.
560. Ejemplo 4:
4 gramos del enzima crudo en el ejemplo 2 se disolvieron en 500 ml de agua y la solución resultante se ajustó a pH 7,5 por empleo de una solución acuosa de sosa 1 N. A esta solución se añadieron 2 gr de 3-metil-7fenoxiacetamido- Δ^3 -cefem-4, carboxilato sódico, y la mezcla resultante se hizo reaccionar a 37°C durante 15 horas. A continuación el líquido de la reacción se liberó de las proteínas mediante Filtro Dia-G- μ H (fabricado por Nippon Vacuum Technique Co.), ajustado al pH a 2,5 por empleo de ácido clorhídrico 1 N, lavándose tres veces con una mitad de la cantidad del mismo de acetato de butilo y ajustando a pH 6,5, con una solución acuosa de sosa 1 N. Este líquido se adsorbió en una columna de 2 x 15 cm de Dowex 1-X8 (tipo ácido acético) y se eluyó con ácido acético 1 N. A continuación, se midió la adsorbancia de cada fracción a 260 m se hizo ensayo biológico después de pulverizar el cloruro de fenoxiacetilo en un papel filtro, y las fracciones contenidas de ácido 7-amino-3-metilo- Δ^3 -cefem-4-carboxílico se recogieron y liofilizaron. El producto seco se disolvió en una cantidad lo más pequeña posible de agua destilada, la solución resultante se ajustó a pH 3,7 por adición de ácido clorhídrico 1 N y se dejó reposar durante la noche enfriando con hielo para depositar cristales incoloros. Los cristales se lavaron con agua de hielo en una cantidad lo más pequeña posible, con acetona y luego se secaron para obtener 792 mg de ácido 7-amino-3-metil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico, punto de fusión 240-242°C. (descom.) rendimiento 69,6%.
- 570.
- 575.
- 580.
- 585.
- 590.

Análisis elemental (para $C_8H_{10}N_2O_3S$)

	<u>C %</u>	<u>H %</u>	<u>N %</u>
Calculado	44.85	4.70	13.0
Encontrado	45.02	4.58	12.95

595

Ejemplo 5

600

A una solución de 10 mg. de enzima crudo obtenido en el ejemplo 2 en 5 ml. de una solución amortiguadora de fosfatos 1 M (pH 7,5) se añadieron 5 mg. de 3 metil-7-fenilacetamida- Δ^3 -cefom-4-carboxilato sódico y la mezcla resultante se hizo reaccionar a 37° C durante 5 horas. A continuación se midieron la proporción de descomposición del ácido 3-metil-7-fenilacetamida- Δ^3 -cefom-4-carboxílico y el rendimiento de 7-ADCA, según el método de determinación (1) citado anteriormente para obtener valores respectivamente del 95% y 91%.

605

Ejemplo 6

610

Se repitió el ejemplo 4, excepto que se utilizó 3-metil-7-fenilacetamida- Δ^3 -cefom-4-carboxilato sódico, en vez del 3-metil-7-fenoxi-acetamida Δ^3 -cefom-4-carboxilato sódico para obtener 849 mg. de ácido 7-amino-3-metil- Δ^3 -cefom-4-carboxílico punto de fusión 239-241° C (descom.) rendimiento 73.5%

Ejemplo 7

615

10 litros de caldo de cultivo filtrado de Bacillus megaterium - B-400 FERM-P N° 748 obtenidos en el ejemplo 2 se ajustaron a pH 7 aproximadamente con ácido acético. Al filtrado se añadieron 300 g de tierra de diatomeas y la mezcla resultante se agitó durante unos 30 minutos. Durante este tiempo, se mantuvo el pH en unos 7. A continuación, el líquido de la reacción se centrifugó mediante un separador centrifugo tipo costa y luego se lavó con agua para obtener 750 g. de celita hénoda (título de enzima 1.200U/g)

620

Ejemplo 8

625

El filtrado de cultivo de Bacillus megaterium B-400 FERM-P N° 748 obtenido en el ejemplo 2, se ajustó a pH 7 aproximadamente. A cada litro de filtrado se añadieron individualmente 50 g. de celita (Cel Super Hyflo), carbón activo (producido por Wako Jun-yaku Co., para cromatografía), combinador de iones de celulosa CM (producido por Serva Co., 0,52 mcg/g) y Amberlita CG-50 (...

630 (forma II), y la mezcla resultante se agitó durante unos 30 minutos. Durante este tiempo, se mantuvo siempre el pH en aproximadamente 7. A continuación, se recuperó cada soporte por filtración y se lavó con agua para obtener un soporte húmedo. La proporción de enzimas de cada soporte se calculó, suponiendo el 100% la proporción de adsorción de enzimas de la Celita. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

635

<u>Soporte</u>	<u>Proporción de adsorción relativa(%)</u>
Celita	100
Carbón activo	100
Celulosa CM	100
Amberlita CG-50	81'2

640 Ejemplo 9

La Celita adsorbida de enzimas desacilantes (título de enzima 1.800 U/gr) obtenida en el ejemplo 8 se tamponó mediante lavado con una solución amortiguadora de fosfatos 0,01 M (pH 7,5) se empaquetó en una columna equipada con dobles paredes (5 x 50) cm. y se lavó durante una hora aproximadamente a caudal constante (velocidad 0,5) con la misma solución amortiguadora que antes.

645 La temperatura exterior de la columna se hizo constante haciendo pasar agua caliente a 37° C por la camisa de la columna, 6 litros (5 mg/ml expresado en ácido libre) de una solución acuosa de 7 fenilacetamida desacetoxi cefalosporonato sódico se pasó a través de la columna a una velocidad constante (Velocidad 0,5) y el líquido de salida se fraccionó en fracciones individuales (Volumen de fracción 10,8 ml). Se precisó un tiempo de aproximadamente 650 16 horas para que la salida terminase.

655 6,4 litros del líquido efluyente total se ajustaron a pH 6 y luego se concentraron aproximadamente a 1/10. El concentrado se ajustó a pH 3,7 con ácido clorhídrico. 6 N, con lo que el 7-ADCA formado empezó a precipitar. Este concentrado se enfrió con hielo para completar la precipitación y el depósito se recuperó 660 por filtración, lavándose con una pequeña cantidad de agua de hielo, secándose con acetona y luego secándose totalmente para obtener 14,0 g. de 7-ADCA blanco, punto de fusión 240-242° C, rendimiento 72,4%. Este producto se disolvió en una solución acuosa de hidróxido sódico 2,5 N y la solución resultante se decoloró con 665

670 carbón activo, ajustándose a pH 3,7 con ácido clorhídrico 6 N y luego enfriándose con hielo para depositar el 7-ADCA. A continuación, se recuperó el 7-ADCA por filtración, lavándose con una pequeña cantidad de agua de hielo, lavándose con acetona y después secándose con lo que se obtuvieron 11,4 g. de un producto purificado.

Ejemplo 10

675 Se repitió el ejemplo 9, excepto que en lugar de la celita absorbidas de enzimas desecilantes, para preparar 7-ADCA se emplearon el carbón activo adsorbente de enzimas, celulosa CM adsorbente de enzimas y Amberlita CG-50 adsorbente de enzimas, obtenidos en el ejemplo 8, Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	<u>Clase de soporte</u>	<u>Cantidad obtenida</u>	<u>Rendimiento</u>
680	Carbón activo	37,5	58,2
	Celulosa CM	32,9	51,8
	Amberlita CG-50	31,3	48,5

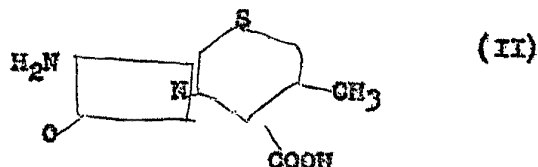
Ejemplo 11

685 El mismo sistema que en el ejemplo 1 se utilizó para obtener un cultivo. Un litro de este cultivo se transfirió a un tanque de 250 litros que contiene 200 l. de un medio de la misma composición que en el ejemplo 1, y se cultivó a 30° C durante 48 horas. Se trataron dos de dichas tanques de 250 litros para obtener 350 l. de un caldo filtrado. Al filtrado de cultivo se añadieron 3,5 Kg de celita y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos manteniendo el pH en 7. A continuación, se centrifugó y el residuo se lavó con agua para obtener 5,2 Kg. de celita húmeda (título del enzima 5.000 U/Gr). Esta celita se colocó en una columna de cloruro de vinilo de 120 x 900 mm, se hizo pasar una solución de 5 ug/ml de ácido 7-fenilacetamido-dosacetoxi cefalosporánico en un tampón de fosfato 0,05 M (pH 7,5) mientras se mantenía la temperatura en 37° C (Cantidad total, 1,8 Kg/360litros medida del flujo 5 litros/hora) 695 La elución se terminó en 72 horas para obtener un total de 375 l. de un eluato. A este eluato se añadieron 290 litros de acetona y la mezcla resultante se ajustó al pH 4,0 con clorhídrico 6 N, se agitó suficientemente durante 30 minutos y luego se dejó reposar durante 700 la noche para depositar un precipitado. El precipitado se recuperó

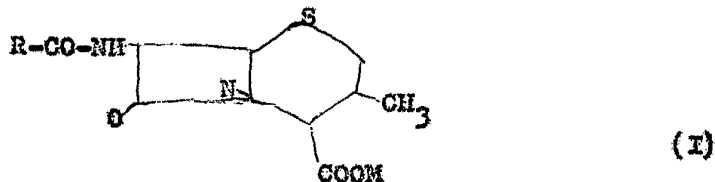
por filtración, lavándose con acetona y luego secándose para obtener 1.130 2 gr. de cristales de 7 ADCA (pureza 90,0%), rendimiento 89,2% .

REIVINDICACIONES

1ª.- Un procedimiento para producir ácido 7 amino desacetoxi cefalosporánico representado por la fórmula:



caracterizado porque se trata a un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico representado por la fórmula; general:



en la que R es un grupo bencilo o fenoximetilo, y M es un átomo metálico alcali capaz de formar una sal hidrosoluble, con un filtrado de cultivo de una cepa productora de enzima perteneciente al género Bacillus que puede descomponer el enlace amida del compuesto mencionado, siendo dicha cepa Bacillus megaterium B-400 FERM-P N° 748, o bien se trata en un medio acuoso con un preparado de enzima obtenido de dicha cepa productora de enzima.

2ª.- Procedimiento de conformidad con las reivindicación 1ª.-, en el que la cepa productora de enzima es adsorbida en un soporte que no inactive a esta última. Se añade una solución acuosa de un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico representado por la fórmula (I) al mencionado soporte que contiene la enzima adsorbida para desacilar dicho ácido, y se recupera ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico del líquido de reacción resultante.

3ª.- Un procedimiento para producir ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de ~~VEINTE~~ hojas y lámina de dibujos que se acompaña.

Madrid,