

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

ES	11 21 22	NUMERO	Y
		FECHA DE PRESENTACION	
		432.549	
		3-12-1.974	

MODELO DE UTILIDAD

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
421.303	3-12-1.973	Estados Unidos

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL
	C 12 B

54 TITULO DE LA INVENCIÓN
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DESACETOXICEFALOSPORINA C.

71 SOLICITANTE (S)
ELI LILLY AND COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS, Indiana 46206 ESTADOS UNIDOS

72 INVENTOR (ES)
Robert L. Hamill; Ramakrishnan Nagarajan de nacionalidad estadounidense e india, respectivamente.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

OF.

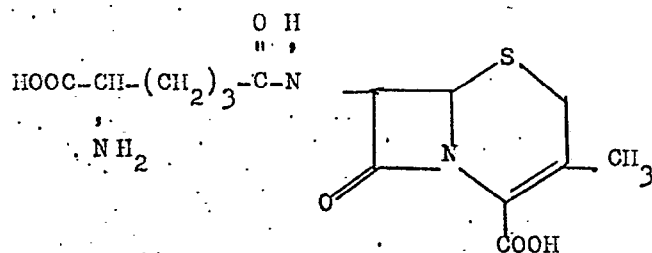
1

La presente invención se relaciona con un procedimiento novedoso para producir deacetoxicefalosporina C. La deacetoxicefalosporina C es útil en la preparación del ácido 7-amino-deacetoxicefalosporánico, 7-ADCA.

5

La deacetoxicefalosporina C, representada por la siguiente fórmula estructural

10



15

ha sido previamente preparada por medio de la hidrogenólisis de la cefalosporina C como es descrito por R. D. Stedman en la Patente de los Estados Unidos Nº 3.124.576.

20

La deacetoxicefalosporina C también ha sido denominada desacetoxicefalosporina C indicando que el grupo acetoximetilo en la posición 3 del anillo de dihidrotiazina de la cefalosporina C es reemplazado con un grupo 3-metilo. La deacetoxicefalosporina C también es denominada, ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-3-metil-3-cefem-4-carboxílico, de acuerdo con el sistema de nomenclatura del cefam.

25

La cefalosporina C, la primera cefalosporina que se descubrió (E. P. Abraham y colaboradores, Patente de los Estados Unidos Nº 3.093.638), se produce cultivando

30

Cephalosporium acremonium. Hasta recientemente los cefalosporios eran los únicos microorganismos conocidos para producir los metabolitos que tienen el núcleo de cefalosporina, es decir, un anillo de beta-lactama condensado a un anillo de dihidrotiazina. Sin embargo, recientemente, R. Nagarajan

1 y colaboradores, J. Amerc. Chem. Soc., 93, 2308-2310 (1971)
dieron a conocer el aislamiento de nuevos compuestos de cefa-
losporina a partir de la cerveza de fermentación de dos
Streptomycetes, S. lipmanii y S. clavuligerus. El primer
5 estreptomiceto produce el ácido 7-(5-amino-5-carboxivalera-
mido)-7-metoxi-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxílico (7-
metoxicefalosporina C), mientras que el último estreptomi-
ceto produce tanto el ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-
7-metoxi-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico como el
10 ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-3-carbamoiloximetil-
3-cefem-4-carboxílico.

La deacetoxicefalosporina C no ha sido producida
hasta la fecha cultivando un organismo de Streptomycetes.

Ahora se ha descubierto que el S. lipmanii y el
15 S. clavuligerus producen un metabolito adicional, la
deacetoxicefalosporina C, la cual puede separarse de los
otros metabolitos y aislarse en una alta pureza.

La deacetoxicefalosporina C es un compuesto de
cefalosporina importante. Por ejemplo, puede experimentar
20 las reacciones de N-desacilación bien conocidas mediante
las cuales se elimina la cadena lateral de 7-(5-amino-5-
carboxivalerilo) para producir el ácido 7-amino-deacetoxi-
cefalosporánico (7-ADCA). La N-desacilación puede llevarse
a cabo con cloruro de nitrosilo tal y como se describe en
25 la Patente de los Estados Unidos N° 3.188.311, o por medio
del método de disociación con pentacloruro de fósforo bien
conocido. descrito, por ejemplo, en las Patentes de los Esta-
dos Unidos Nos. 3.549.628, 3.575.970, y 3.697.515. El
7-ADCA es un intermediario útil que puede acilarse para pro-
ducir una amplia variedad de ácidos 7-acilamidodeacetoxi-
30

1

cefalosporánicos, notablemente, el antibiótico de cefalexina

5

Esta invención se relaciona con un método para producir la deacetoxicefalosporina C que comprende cultivar S. lipmanii NRRL 3584 y S. clavuligerus NRRL 3585 en medios de cultivo nutritivos acuosos bajo condiciones de fermentación aeróbica sumergida.

10

La deacetoxicefalosporina C se recupera del caldo de fermentación filtrado junto con los demás antibióticos coproducidos y se separa de la mezcla recuperada mediante cromatografía. La deacetoxicefalosporina C se purifica mediante cromatografía adicional sobre celulosa.

15

De acuerdo con el procedimiento de esta invención, la deacetoxicefalosporina C se produce cultivando un estreptomiceto seleccionado del grupo que consiste en Streptomycetes lipmanii NRRL 3584 y Streptomycetes clavuligerus NRRL 3585.

20

El procedimiento se lleva a cabo cultivando uno de los microorganismos anteriores en un medio de cultivo nutritivo acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno, y sales inorgánicas bajo condiciones de fermentación aeróbica sumergida hasta que se produce una cantidad sustancial de actividad antibiótica en el medio de cultivo. Además de la deacetoxicefalosporina C, la 7-metoxicefalosporina C, también designada como antibiótico A-16884, se co-produce mediante S. lipmanii. El S. clavuligerus también coproduce junto con la deacetoxicefalosporina C, el ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-7-metoxi-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico y el ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, ambos de los cuales también han sido designados respectivamente como

25

30

antibióticos A-16886I y A-16886II. Aun cuando la deacetoxi-

1 cefalosporina C se produce por ambos microorganismos en
cantidades menores que las otras cefalosporinas coprodu-
cidas, puede separarse fácilmente de estos antibióticos y
aislarse en una forma purificada por medio de cromatografía
5 como se describió en lo que antecede.

Ambos de los microorganismos empleados en el méto-
do de esta invención se aíslan de muestras de tierra obte-
nidas de Sudamérica. Los organismos se aíslan de las
muestras de tierra suspendiendo porciones de las muestras
10 de tierra en agua destilada estéril, y precipitando las sus-
pensiones en agar nutritivo. Las placas de agar nutritivo
sembradas se incuban a una temperatura de 25-35°C., durante
varios días. Al final de período de incubación, las colo-
nias de microorganismos se transfieren con una malla de pla-
tino estéril a cultivos de agar. Los cultivos de agar des-
15 pués se incuban para proporcionar cantidades adecuadas de
sustancia de inoculación para la producción de la deacetoxi-
cefalosporina C.

Las cepas de los microorganismos empleados en el
20 procedimiento son actinomicetos y han sido identificados por
los siguientes métodos recomendados por el International
Streptomyces Project (Shirling y colaboradores, "Method
for Characterization of Streptomyces Species", Intern. Bull.
Systematic Bacteriol., 16, 313-340 [1966]) para la caracte-
25 rización de las especies de Streptomyces. También se emplean
pruebas suplementarias adicionales en la caracterización.

Las características taxonómicas del S. lipmanii
NRRL 3584 y S. clavuligerus NRRL 3585 se presentan en las
siguientes tablas y párrafos. En las tablas, los nombres
30 del color son asignados de acuerdo con el método de ISCC-

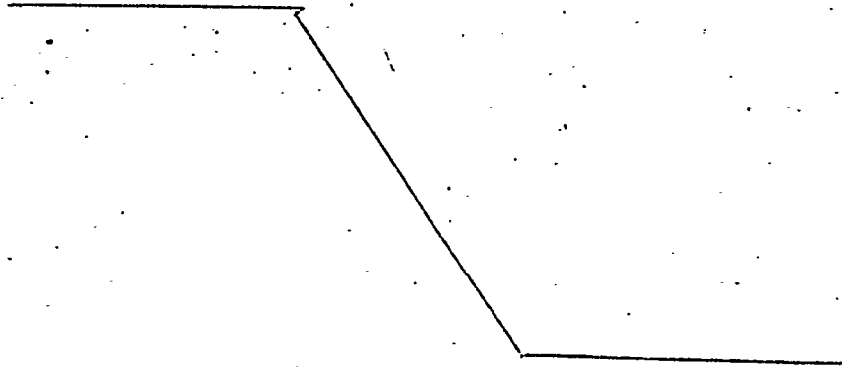
1 NBS descrito por Kelly y colaboradores en The ISCC-NBS
Method of Designatin Colors and a Dictionary of Color Names
(Departamento de Comercio de los Estados Unidos Circ. 553,
Washington, D. C. 1955). Los números entre paréntesis se
5 refieren a las series de color de Tresner & Backus (Tresner
y colaboradores, "System of Color Wheels for Streptomyces
Taxonomy", Appl. Microbiol., 11, 335-338 [1963]) y las desig-
naciones de comprobación del color están subrayadas. Los
bloques de colores de Maerz & Paul (Maerz y colaboradores,
10 Dictionary of Color [McGraw-Hill Book Co., Inc., New York,
1950]) están encerrados en paréntesis angulares. Los culti-
vos se desarrollan a una temperatura de 30°C., durante 14
días a menos que se especifique de otra manera.

15 Morfología del S. linmanii NRRL 3584

Los esporócoros usualmente son rectos a flexuosos
produciéndose ganchos ocasionales: las esporas son cortas,
cilíndricas, 0,5-1,5 μ x 1,0-2,5 μ y se presentan usualmente
en cadenas de 3-10 y ocasionalmente de 10-50. Las esporas
20 son de contorno liso según se observa por medio de microsco-
pía electrónica.

25

30



1

TABLA I

5

Características del Cultivo del S. lipmanii NRRL 3584

10

15

20

25

30

<u>Medio</u>	<u>Características d</u>
ISP Nº. 2 (Agar de Levadura-Extracto de Malta)	Desarrollo moderado, [8H9]; micelio aéreo,
ISP No. 3 (Agar de Harina de Avena)	Desarrollo moderado, r [13E4]; micelio aéreo rillo pálido (Y) <u>2db.</u>
ISP No. 4 (sales inorgánicas y Agar de Almidón Soluble)	Desarrollo moderado, r lio aéreo moderado, am
ISP No. 5 (Agar de Glicerol - Asparagina)	Desarrollo abundante, [13U7]; micelio aéreo lento (R) <u>5dc.</u>
Agar de pasta de tomate-harina de avena	Desarrollo abundante, ceo [15E3]; micelio aéreo (GY) <u>2dc.</u>
Agar de Emersons	Desarrollo moderado, r oscuro [8E9]; micelio a
Agar de Bennetts	Desarrollo abundante, [14E7]; micelio aéreo
Agar de Czapeks	Desarrollo escaso, bla
Agar de glucosa-asparagina	Desarrollo abundante, micelio aéreo abundant
Agar de Tirosina	Desarrollo moderado, r [12C5]; micelio abunda <u>3ec.</u>
Agar nutritivo	Desarrollo moderado, r hay micelio aéreo.
Agar de Malato de Calcio	Desarrollo moderado, r muy escaso.
<u>Fisiología</u>	
Acción sobre la leche	Coagulación, peptoniza

lipmanii NRRL 3584

Características de Desarrollo

urrollo moderado, reverso pardo grisáceo oscuro
[7]; micelio aéreo, amarillo pálido (Y) 2db.

urrollo moderado, reverso amarillo grisáceo oscuro
[4]; micelio aéreo moderado, blanco (W) 13ba a ama-
lo pálido (Y) 2db.

urrollo moderado, reverso gris parduzco [7C7] ; mico-
aéreo moderado, amarillo pálido (Y) 2db.

urrollo abundante, reverso pardo amarillento claro
[7]; micelio aéreo abundante, rosa grisáceo amari-
o (R) 5dc.

urrollo abundante, reverso pardo amarillento grisá-
[15E8]; micelio aéreo abundante, gris amarillento
2dc.

urrollo moderado, reverso pardo amarillento grisáceo
uro [8E9]; micelio aéreo y esporas ausentes.

urrollo abundante, reverso pardo amarillento mediano
[7]; micelio aéreo abundante, amarillo grisáceo (R) 3ec.

urrollo escaso, blanco; micelio aéreo escaso (W) 13ba.

urrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [12D4];
elio aéreo abundante, gris amarillento (GY) 2dc.

urrollo moderado, reverso pardo amarillento claro
[5]; micelio abundante, amarillo grisáceo (R)

urrollo moderado, reverso amarillo pálido [11C1]; no
micelio aéreo.

urrollo moderado, reverso negro [56C1]; micelio aéreo
escaso.

ulación, peptonización

TABLA I (Cont.)

<u>Fisiología</u>	<u>Características de Desarrollo</u>
Reducción de Nitrato	Positiva
Producción de Melanina	
Agar de Peptona-hierro	Negativa
Caldos de triptona-extracto de Levadura	Negativa
Requerimientos de temperatura en el agar de pasta de tomate-harina de avena	Desarrollo abundante y esporulación a una temperatura de 26°C.; y 30°C.; ligero desarrollo a una temperatura de 37°C.; no hay desarrollo a 43°C.
Respuesta del color vegetativo al cambio de pH	
HCl 0,05N	El pigmento gris pardusco cambia a rojo
NaOH 0,05N	Sin cambio
Licuefacción de la gelatina	100%

1

5

10

15

20

25

30

1

TABLA I (Cont.)

	<u>Fisiología</u>	<u>Características de</u>
5	Reducción de Nitrato	Positiva
	Producción de Melanina	
	Agar de Peptona-hierro	Negativa
	Caldo de triptona-extracto de Levadura	Negativa
10	Requerimientos de temperatura en el agar de pasta de tomate-harina de avena	Desarrollo abundante y de 26°C.; y 30°C.; ligero de 37°C.; no hay desarrollo
	Respuesta del color vegetativo al cambio de pH	
	HCl 0,05N	El pigmento gris pardo
	NaOH 0,05N	Sin cambio
15	Licuefacción de la gelatina	100%
20		
25		
30		

(Cont.)

Características de Desarrollo

Positiva

Negativa

Negativa

Desarrollo abundante y esperulación a una temperatura de 26°C.; y 30°C.; ligero desarrollo a una temperatura de 37°C.; no hay desarrollo a 43°C.

El pigmento gris pardusco cambia a rojo

Sin cambio

100%

1 En la Tabla II se exponen los resultados de las pruebas de la utilización de carbono llevadas a cabo sobre el S. lipmanii NRRL. En la tabla, se emplean los siguientes símbolos:

- 5 + = desarrollo y utilización
- = no hay desarrollo, sin utilización

TABLA II

Patrón de Utilización del Carbono para el NRRL 3584

10

<u>Compuesto</u>	<u>Respuesta del Desarrollo</u>
L-arabinosa	-
Sucrosa	-
15 D-xilosa	+
D-fructosa	-
glucosa	+
rannosa	-
rafinosa	-
20 i-inositol	-
D-manitol	-
Control (sin carbono)	-

20

25

El S. clavuligerus NRRL 3585 es difícil de clasificar en el género Streptomyces debido a su morfología del esporóforo atípica. Sin embargo, los datos en el análisis de la pared celular indican que el cultivo debe considerarse una especie en el género del Streptomyces. En consecuencia, el organismo es tratado como una nueva especie y se le da el nombre de Streptomyces clavuligerus.

30

Este organismo produce característicamente una red

1 extensiva de hifas aéreas cortas, simpodialmente ramificadas,
las cuales eventualmente se segmentan en esporas. Se forman
ramificaciones laterales de forma de bastones que usualmente
producen de una a cuatro esporas cada una. No se producen
5 conidias de sustrato. Las micrografías electrónicas reve-
lan esporas de pared lisa. Las preparaciones de la pared
celular contienen el L,L-isómero de ácido diaminopimélico y
glicina además de los constituyentes principales, ácido as-
pártico, ácido glutámico, y alanina. Las esporas son grises
10 en masse y el micelio primario es amarillo pálido a amarillo-
pardo. No se produce pigmento soluble. El cultivo tiene una
escala de temperatura óptima entre 26° y 30°C. No ocurre
desarrollo a una temperatura de 37°C. Morfológicamente, es-
te cultivo se asemeja a ciertas cepas de Thermomonospora y
15 Micromonospora.

Las características del S. clavuligerus NRRL 3585
se presentan en las siguientes tablas y párrafos.

Morfología del S. clavuligerus NRRL 3585

20 Se producen esporóforos en un micelio aéreo exten-
sivo y consiste de redes de hifas cortas, simpodialmente
ramificadas. Usualmente de una a cuatro esporas nacen en
ramificaciones laterales de forma de bastones. Eventualmen-
te los esporóforos se segmentan para formar cadenas de espo-
25 ras. Las esporas son de 0,34-0,85 μ x 0,85 x 3,3 μ , teniendo
un promedio de 0,64 μ x 1,53 μ . Las micrografías electró-
nicas revelan esporas de pared lisa. No se producen esporas
en el micelio del sustrato.

30

TABLA III

Características de Cultivo de la S. clavuliferus NRRL 2585

<u>MEDIO</u>	<u>Características de Desarrollo</u>
ISP N° 2 (Agar de Levadura-Extracto de Malta)	Desarrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [12K3]; micelio aéreo abundante, gris oscuro (G) 2ih [21M1]; no hay pigmento soluble.
ISP N° 3 (Agar de harina de Avena)	Desarrollo moderado, reverso amarillo pálido [11C1]; micelio aéreo regular, blanco (W) b [27A1]; no hay pigmento soluble.
ISP N° 4 (Agar de Sales Inorgánicas-Almidón)	Desarrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [12P1]; micelio aéreo moderado, gris medio (GY) 2lc [45A1]; no hay pigmento soluble.
ISP N° 5 (Agar de Glicerol-asparagina)	Desarrollo regular, reverso verde amarillo pálido [10L1]; micelio aéreo regular, blanco (W) A; no hay pigmento soluble.
Agar de pasta de tomate-harina de avena	Desarrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [11B4]; micelio aéreo moderado, color oliva grisáceo ligero (GR) 1-1/21K [21L1]; no hay pigmento soluble.
Agar de Emerson	Desarrollo abundante, reverso amarillo pálido [11C1]; micelio aéreo escaso; no hay pigmento soluble.
Agar de Bennett	Desarrollo abundante, reverso amarillo claro [11J2]; micelio aéreo abundante, verde grisáceo oscuro (GN) 2h-1/21h [23A3]; no hay pigmento soluble.
Agar de Czapek	Desarrollo escaso
Agar de Glucosa-Asparagina	Desarrollo moderado, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo regular, blanco (W) b [27A1]; no hay pigmento soluble.
Agar de Tirosina	Desarrollo moderado, reverso amarillo pálido [10H2]; micelio aéreo moderado, gris amarillento (GY) 2dc [10A2]; no hay pigmento soluble.
Agar Nutritivo	Desarrollo regular, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo escaso, blanco; no hay pigmento soluble.
Malato de Calcio	Desarrollo abundante, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo regular, blanco (W) A.
Acción sobre la leche	No hay coagulación; clarificación en 17 días.
Reducción del Nitrato	Negativa.
Licuefacción de la Gelatina	Ninguna.

TABLA III

Características de Cultivo de la S. clavuligerus NRRL

	<u>MEDIO</u>	<u>Características de</u>
1		
5	ISP N° 2 (Agar de Levadura-Extracto de Malta)	Desarrollo abundante [12K3]; micelio aéreo [21B1]; no hay pigmento.
	ISP N° 3 (Agar de harina de Avena)	Desarrollo moderado micelio aéreo regular pigmento soluble.
10	ISP N° 4 (Agar de Sales Inorgánicas-Almidón)	Desarrollo abundante [12B2]; micelio aéreo [45A1]; no hay pigmento.
	ISP N° 5 (Agar de glicerol-asparagina)	Desarrollo regular, [10B1]; micelio aéreo pigmento soluble.
	Agar de pasta de tomate-harina de avena	Desarrollo abundante micelio aéreo moderado (GN) L-1/2ig [21B1];
15	Agar de Emerson	Desarrollo abundante micelio aéreo escaso.
	Agar de Bennett	Desarrollo abundante micelio aéreo abundante, pero no hay pigmento soluble.
20	Agar de Czapek	Desarrollo escaso.
	Agar de Glucosa-Asparagina	Desarrollo moderado, micelio aéreo regular pigmento soluble.
	Agar de Tirosina	Desarrollo moderado, micelio aéreo moderado, gris pigmento soluble.
25	Agar Nutritivo	Desarrollo regular, micelio aéreo escaso.
	Malato de Calcio	Desarrollo abundante micelio aéreo regular.
	Acción sobre la leche	No hay coagulación;
	Reducción del Nitrato	Negativa.
30	Licuefacción de la Gelatina	Ninguna.

III

de la S. clavuligerus NRRL 3525

Características de Desarrollo

Desarrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [12K3]; micelio aéreo abundante, gris oscuro (G) 3ih [21B1]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo moderado, reverso amarillo pálido [11C1]; micelio aéreo regular, blanco (W) b [27A1]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [12B2]; micelio aéreo moderado, gris medio (GY) 2fe [45A1]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo regular, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo regular, blanco (W) a; no hay pigmento soluble.

Desarrollo abundante, reverso amarillo grisáceo [11E4]; micelio aéreo moderado, color oliva grisáceo ligero (GN) 1-1/2ig [21B1]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo abundante, reverso amarillo pálido [11C1]; micelio aéreo escaso; no hay pigmento soluble

Desarrollo abundante, reverso amarillo claro [11J2]; micelio aéreo abundante, verde grisáceo oscuro (GN) 24-1/2ih [23A3]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo escaso

Desarrollo moderado, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo regular, blanco (W) b [27A1]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo moderado, reverso amarillo pálido [10B2]; micelio aéreo moderado, gris amarillento (GY) 2dc [10A2]; no hay pigmento soluble.

Desarrollo regular, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo escaso, blanco; no hay pigmento soluble.

Desarrollo abundante, reverso verde amarillo pálido [10B1]; micelio aéreo regular, blanco (W) a.

No hay coagulación; clarificación en 17 días.

Negativa.

Ninguna.

TABLA III (Cont.)

<u>Medio</u>	<u>Características de Desarrollo</u>
Respuesta del Desarrollo a los cambios en el pH	pH de 5,0-6,0 en la escala óptima para el desarrollo; desarrollo pero no esporulación de pH de 7,5-8,5.
Producción de Melanina	Ninguna.
Asar de Peptona-hierro y Caldo de triptona-extracto de levadura	Desarrollo y esporulación, buenos de 26-30°; no hay desarrollo a una temperatura de 37° o a una temperatura superior.
Requerimientos de Temperatura	ácido L, L-diaminopimélico, cisticina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, y leucina.
Constituyentes principales de los hidrolizados celulares totales	

1

5

10

15

20

25

30

1

TABLA III (Cont.)

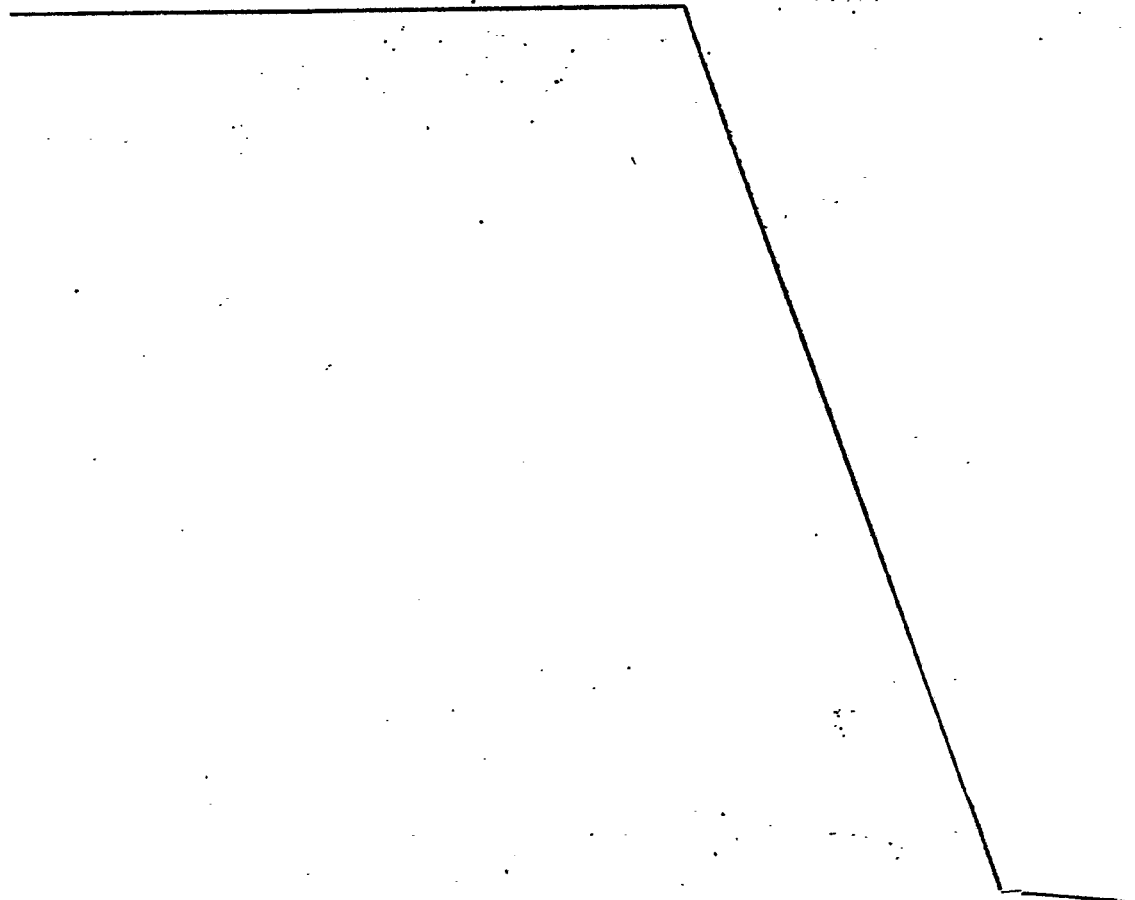
	<u>Medio</u>	<u>Características</u>
5	Respuesta del Desarrollo a los cambios en el pH Producción de Melanina Agar de Peptona-hierro y Caldo de triptona-extracto de levadura	pH de 5,0-6,0 en la desarrollo pero no e Ninguna.
10	Requerimientos de Temperatura	Desarrollo y esporul rrollo a una tempera rior.
	Constituyentes principales de los hidrolizados celulares totales	ácido L,L-diaminopim aspártico, alanina,

15

20

25

30



II (Cont.)

Características de Desarrollo

pH de 5,0-6,0 en la escala óptima para el desarrollo; desarrollo pero no esporulación de pH de 7,5-8,5.

Ninguna.

Desarrollo y esporulación buenos de 26-30°; no hay desarrollo a una temperatura de 37° o a una temperatura superior.

ácido L,L-diaminopimélico, glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, y leucina.

1 En la Tabla IV se exponen los resultados de las pruebas de la utilización del carbono llevadas a cabo sobre el S.clavuligerus NRRL 3585. En la tabla, se emplean los siguientes símbolos:

- 5
- + = desarrollo y utilización
 - = no hay desarrollo, sin utilización
 - (+) = utilización probable
 - (-) = utilización dudosa

10 TABLA IV

Patrón de Utilización del Carbono para el NRRL 3585

<u>Compuesto</u>	<u>Respuesta del Desarrollo</u>
15 Utilización del Carbono:	
L-arabinosa	-
ramnosa	-
fructosa	-
D-xilosa	-
20 melezitosa	(-)
rafinosa	-
dextrosa	-
celobiosa	-
maltosa	+
25 sucrosa	-
celulosa	-
inositol	(+)
manitol	-
glumato de Na	(+)

30

1 Los estreptomicetos de esta invención han sido
colocados en el depósito permanente sin restricción en cuan-
to a su disponibilidad con la colección de cultivo permanen-
te de la Northern Utilization Research and Development
5 Division, Servicio de Investigación Agrícola, Departamento
de Agricultura de los Estados Unidos, Peoria, Illinois
61604. El Streptomyces lipmanii ha sido asignado el culti-
vo N° NRRL 3584 y el Streptomyces clavuligerus el cultivo
N° NRRL 3585.

10 Como se manifestó previamente, la deacetoxicefa-
losporina C se produce cultivando cualesquiera de los
Streptomyces descritos anteriormente en un medio de culti-
vo nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas. El medio de
cultivo empleado puede ser cualquiera de una variedad de me-
15 dios, ya que estos microorganismos son capaces de desarro-
llar y producir los metabolitos descritos utilizando numero-
sas fuentes de carbono, nitrógeno, y sales inorgánicas.
Para la producción de fermentación en gran escala en donde
la economía de la producción es un factor significativo y
20 en donde son consideraciones importantes el rendimiento má-
ximo del antibiótico y la facilidad de aislamiento del mis-
mo, se prefieren ciertas fuentes nutritivas. Por ejemplo,
los medios que son útiles en la producción de la deacetoxi-
cefalosporina C incluyen fuentes asimilables de carbono ta-
25 les como glucosa, almidón, glicerina, melazas, o dextrina.
La fuente de carbono preferida es la glucosa. Adicionalmen-
te, los medios empleables incluyen fuentes de nitrógeno asi-
milables tales como harina de soja, sólidos de infusión de
maiz, levadura, harina de semilla de algodón, extracto de
30 carne, peptonas (carne o soja) caseína, o mezclas de amino-

1 ácidos. Las fuentes preferidas de nitrógeno son las pepto-
nas, harina de soja, o mezclas de aminoácidos. Entre las
sales inorgánicas nutritivas que se pueden incorporar en
5 los medios de cultivo están las sales comunes capaces de
producir iones de sodio, potasio, amonio, calcio, fosfato,
sulfato, cloruro, carbonato y similares.

10 Elementos menores necesarios para el crecimiento
y desarrollo óptimos del organismo utilizado para la produc-
ción de la deacetoxicefalosporina C también pueden incluirse
en el medio de cultivo. Tales oligoelementos comúnmente
están presentes como impurezas en los demás constituyentes
del medio en cantidades suficientes para satisfacer los re-
querimientos de desarrollo de los actinomicetos empleados en
esta invención.

15 El pH inicial del medio de cultivo puede variarse.
Sin embargo, se ha encontrado deseable que el pH inicial del
medio esté entre 6,5 y 7,2. Como se ha observado con otros
actinomicetos, el pH del medio aumenta gradualmente durante
20 el período de desarrollo del organismo mientras se está pro-
duciendo el antibiótico, y puede alcanzar un nivel de desde
6,7 hasta 7,5 o un nivel superior, el pH final dependiendo
por lo menos en parte del pH inicial del medio, los regulado-
res presentes en el medio, y el período de tiempo que se deja
desarrollar el organismo.

25 Las condiciones del cultivo aeróbicas sumergidas
son las condiciones de selección para la producción de la
deacetoxicefalosporina C. Para la preparación de cantidades
relativamente pequeñas, pueden emplearse el matraz de agita-
ción y el cultivo superficial en botellas; pero para la pro-
30 ducción en grandes cantidades, se prefiere el cultivo aeróbi-

1 co sumergido en tanques estériles. El medio en el tanque
estéril puede inocularse con una suspensión esporulada; pero
debido al retraso experimentado en el desarrollo cuando se
5 utiliza una suspensión esporulada como la sustancia de ino-
culación, se prefiere la forma vegetativa del cultivo.
Evitando de esta manera el retraso en el desarrollo, se efec-
túa un uso más eficiente del equipo de fermentación. En
consecuencia, es deseable primero producir una sustancia de
inoculación vegetativa del organismo inoculando una cantidad
10 relativamente pequeña del medio de cultivo con la forma de
espora del organismo; y cuando se ha obtenido una sustancia
de inoculación vegetativa activa, joven, se transfiere la
sustancia de inoculación vegetativa asépticamente al tanque
grande. El medio en el cual se produce la sustancia de ino-
15 culación puede ser el mismo que o un medio diferente del me-
dio utilizado para la producción en gran escala.

Los microorganismos que producen la deacetoxi-
cefalosporina C se desarrollará en una amplia escala de tem-
peraturas de entre aproximadamente 25-37°C. Parece ocurrir
20 una producción óptima a temperaturas de 26-30°C. En gene-
ral, la producción máxima del antibiótico ocurre dentro de
aproximadamente 36-72 horas después de la inoculación del
medio de cultivo.

Como es usual en los procedimientos de cultivo
25 sumergido aeróbico, se sopla aire estéril a través del me-
dio de cultivo. Para un desarrollo eficiente del organis-
mo y de la producción del antibiótico, el volumen de aire
empleado en la producción en tanque es de aproximadamente
30 0,2 a 0,4 volúmenes de aire por minuto por volumen de cul-
tivo.

1

La concentración de la actividad del antibiótico en el medio de cultivo puede seguirse fácilmente durante el período de fermentación probando muestras del medio de cultivo con respecto a su actividad inhibitoria contra el desarrollo de los organismos que muestran ser inhibidos por la presencia de la deacetoxicefalosporina C. Los organismos Sarcina lutea y Salmonella gallinarum se han encontrado útiles para este objeto. La prueba de las muestras puede llevarse a cabo por medio de los métodos turbidométrico o de placa de disco bien conocidos.

5

10

En general, la producción máxima de la actividad del antibiótico ocurre dentro de uno a tres días después de la inoculación del medio de cultivo en procedimientos de cultivo aeróbico sumergido o de cultivo en matraz de agitación.

15

20

La actividad del antibiótico producida durante la fermentación de ambos estreptomicetos ocurre en el caldo antibiótico. En consecuencia, las técnicas de aislamiento empleadas en el presente método son designadas para permitir la recuperación máxima del antibiótico del caldo. Así, por ejemplo, el micelio y los sólidos no disueltos se recogen del caldo de fermentación por medio de los métodos convencionales tales como la filtración o la centrifugación, y la mezcla de antibióticos producida puede recuperarse del caldo filtrado o centrifugado empleando la técnica de extracción o de absorción.

25

30

La deacetoxicefalosporina C se recupera del caldo de fermentación filtrado como un componente de la mezcla de antibióticos producida en la fermentación. La deacetoxicefalosporina C después se separa de los otros componentes

1 antibióticos en la mezcla (por ejemplo, los antibióticos A-16886I, A-16886II y A-16884 previamente discutidos) y se aísla como un componente esencialmente puro mediante cromatografía en columna.

5 Para la recuperación de la mezcla de antibióticos por medio de las técnicas de absorción, se prefieren las resinas de intercambio iónico, sin embargo, la recuperación también puede obtenerse con materiales de absorción tales como carbono, gel de sílice, alúmina o celulosa.

10 La deacetoxicefalosporina C, y los antibióticos coproducidos mencionados anteriormente pueden existir en el caldo de fermentación en la forma de sal o en la forma anfotérica (forma zwitteriónica) dependiendo del pH final del caldo. La mezcla de antibióticos puede recuperarse y separarse uno del otro por medio de cromatografía de absorción o por medio de cromatografía de intercambio iónico cuando existen en cualquier forma o como mezclas de los mismos.

15 Las resinas de intercambio iónico preferidas para la recuperación de la mezcla de antibióticos son aquellas del tipo de amonio cuaternario de poliestireno reticulado vendidas comercialmente bajo los nombres de fábrica de Amberlite y resinas IRA (Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pa.) y resina Dowex (Dow Chemical Co.), por ejemplo las resinas IRA-68 y Dowex 1.

20 El caldo de fermentación filtrado se hace pasar sobre una columna empacada con una resina aniónica tal como IRA-68 y posteriormente los antibióticos se eluyen de la misma con una solución acuosa de acetato de amonio, acetato de sodio, o formato de amonio. Los antibióticos son eluidos en la forma de la sal formada con el catión de la solu-

25

30

1

ción de sal de elución. Antes de la cromatografía de intercambio iónico, los antibióticos se separan del caldo de fermentación filtrado y se purifican parcialmente mediante absorción sobre carbono activado.

5

Después de la recuperación de la mezcla de antibióticos que contiene la deacetoxicefalosporina C de la columna de intercambio iónico, los materiales inorgánicos en exceso tales como la sal en exceso de la solución de sal de elución, por ejemplo, el formato de amonio, pueden recogerse del eluato de resina mediante cromatografía del eluato sobre carbono.

10

La mezcla de antibióticos así recuperada y purificada después se cromatografía sobre gel de sílice o celulosa (microcristalina) para obtener la separación de los componentes antibióticos individuales de la mezcla.

15

De acuerdo con una modalidad de esta invención el S. lipmanii NRRL 3584 se cultiva en un medio de cultivo nutritivo acuoso durante 6 días a una temperatura de aproximadamente 30°C. El micelio y los demás insolubles se filtran con la ayuda de un auxiliar de filtración y el caldo filtrado se hace pasar sobre una columna empacada con carbono activado. La columna se lava con agua para eliminar las impurezas y la actividad antibiótica se eluye con acetona acuosa. Se recogen fracciones múltiples y las fracciones activas se combinan. Las fracciones combinadas se evaporan bajo presión reducida para eliminar la acetona. El concentrado acuoso después se cromatografía sobre una resina de intercambio iónico del tipo de amonio cuaternario de poliestireno tal como el vendido comercialmente como resina

20

25

30

Amberlite IRA-68 (Rohm y Haas, Philadelphia, Pa.) en el ci-

1 clo de formato o acetato. La columna se lava con agua y
después la actividad antibiótica se eluye con una solución
diluída de formato de amonio acuosa de aproximadamente 0,1
5 Molar. Se recogen fracciones múltiples de eluato y las frac-
ciones activas se combinan y se purifican adicionalmente me-
diante cromatografía sobre carbono activado. El eluato que
contiene el antibiótico se concentra y se seca por congela-
ción. La preparación secada por congelación se disuelve en
10 agua y la solución se cromatografía sobre gel de sílice. La
eluación de la columna se lleva a cabo con acetonitrilo acuoso
u otro solvente adecuado. Se recogen fracciones múltiples
de eluato. Las primeras fracciones contienen el antibiótico
A-16884, el ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-7-metoxi-
3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxílico como la sal de amonio.
15 Posteriormente, las fracciones que contienen una mezcla de
A-16884 y penicilina N se eluyen. Las últimas fracciones
contienen la deacetoxicefalosporina C como la sal de amonio.

La forma de ácido libre de la deacetoxicefalospori-
na C puede obtenerse ajustando el pH de una solución acuosa
20 de la sal de amonio al punto isoeléctrico. Alternativamente,
el ácido libre puede obtenerse tratando una solución acuosa
de la sal con una resina de intercambio iónico ácido y em-
pleando suficiente resina acídica para ajustar el pH de la
solución a aproximadamente un pH de 2,5. La resina se filtra
25 de la solución acídica y el filtrado se seca por congelación
para proporcionar la forma de ácido libre.

En una modalidad adicional del procedimiento de
esta invención, el S. Clavuligerus NRRL 3585 se cultiva en
un medio nutritivo acuoso durante aproximadamente 6 días,
30 el micelio se filtra y el caldo filtrado se cromatografía

1 sobre carbono activado y después sobre una resina de inter-
cambio aniónico básica del tipo de amonio cuaternario de
poliestireno tal como aquellas disponibles comercialmente
bajo los nombres de fábrica de Dowex (Dow Chemical Co.,
5 Midland, Mich.) y Amberlite IRA (Rohm and Haas, Philadelphia,
Pa.). De preferencia, las resinas se emplean en el ciclo
de formato o de acetato. El eluato de la resina de intercam-
bio se recromatografía sobre carbono activado para eliminar
el exceso de sustancias inorgánicas, después sobre dextrano
10 y finalmente sobre gel de sílice. La columna de gel de sí-
lice se eluye con acetonitrilo y se recogen fracciones múl-
tiples. Las fracciones biológicamente activas se combinan
y se evaporan o preferiblemente se secan por congelación.
La mezcla de metabolitos antibióticos secada por congela-
15 ción contiene como un componente menor, la deacetoxicefalo-
sporina C. La deacetoxicefalosporina C se separa de la mez-
cla sometiendo primero la mezcla a cromatografía sobre celu-
losa microcristalina (Avicel), seguido por la separación de
los metabolitos sobre resina de Amberlite XAD-4. La mezcla
20 secada por congelación se disuelve en agua y se pasa sobre
una columna empacada con celulosa microcristalina. La colum-
na se eluye con una mezcla de acetonitrilo:n-propanol:agua
(1:1:0,5 v:v:v), y las fracciones de eluato activas se com-
binan y se concentran al vacío y el concentrado se liofiliza.
25 La mezcla antibiótica liofilizada se disuelve en agua y des-
pués se cromatografía sobre resina de Amberlite XAD-4. La
columna se eluye con agua y se recogen fracciones múltiples.
Las fracciones de eluato se comprueban mediante cromatogra-
fía en papel o mediante análisis microbiológico y todas las
30 fracciones que muestran contener solamente la deacetoxi-

1 cefalosporina C se combinan y se liofilizan. Las primeras
fracciones de eluato contienen los antibióticos conocidos
A-16886I y 16886II, denominados ácido 7-(5-amino-5-carboxi-
5 valeramido)-7-metoxi-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxíli-
co y ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-3-carbamoiloxime-
til-3-cefem-4-carboxílico, respectivamente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilus-
trar adicionalmente el procedimiento de esta invención.

10

EJEMPLO 1

PRODUCCIÓN EN MATRAZ DE AGITACION DE LA DEACETOXICEFALOSPO-
RINA C

15

Se produce un cultivo esporulado de Streptomyces
lipmanii NRRL 3584 desarrollando el organismo sobre un cul-
tivo de agar nutritivo que tiene la siguiente composición:

20

Dextrina	10,00 g.
Extracto de Levadura	1,00 g.
Caseina Hidrolizada ("Amina-N-Z-Tipo A"), Sheffield Chemical Company)	2,00 g.
Extracto de Carne	1,00 g.
Agar Meer (lavado tres veces)	20,00 g.
25 Agua desionizada	1 litro

El pH del medio se ajusta a un pH 7,0 mediante la adición
de hidróxido de sodio.

30

El cultivo de agar se inocula con esporas de
Streptomyces lipmanii NRRL 3584 y se incuba a una tempera-
tura de 30°C., durante 6 días. El cultivo de agar después

1 se cubre con agua destilada estéril y se raspa suavemente para recoger las esporas y las células como una suspensión acuosa del mismo. Un mililitro de la suspensión resultante se utiliza para inocular cada 100 ml. de un medio vegetativo que tiene la siguiente composición:

5	Glucosa	15,00 g
	Harina de Soja	15,00 g.
	Sólidos de infusión de maíz	5,00 g.
10	Carbonato de calcio	2,00 g.
	Cloruro de sodio	5,00 g.
	Agua desionizada	1 litro.

15 El pH del medio vegetativo se ajusta a un pH de 6,7 por medio de la adición de hidróxido de sodio.

El medio vegetativo se agita durante 36 horas a una temperatura de 30°C., en un agitador recíproco con una carrera de dos pulgadas (5,08 cm.) a 108 rpm. El medio así preparado después se utiliza como la sustancia de inoculación para el medio de producción.

20 Se prepara un medio de producción que tiene la siguiente composición:

25	Harina de Soja	15,00 g.
	Caseína	1,00 g.
	Nitrato de sodio	3,00 g.
	Jarabe de glucosa (50% de glucosa)	20,00 g.
	Agua del grifo	1 litro.

30 Porciones de cien mililitros del medio de producción se colocan en matraces Erlenmeyer con una capacidad de 500 mili-

1 litros que fueron esterilizados a una temperatura de 120°C.,
durante 30 minutos. Cuando se enfría, cada matraz se inocu-
la con una sustancia inoculante vegetativa al cinco por cien-
to. La fermentación se agita durante 72 horas a una tempe-
5 ratura de 30°C. en un agitador giratorio que funciona a 250
rpm. Durante la fermentación, el medio se ventila con aire
estéril a una régimen de 0,4 v./v./min. El aislamiento se
lleva a cabo esencialmente como se reporta a continuación
en el Ejemplo 3.

10

EJEMPLO 2

15

Se produce la deacetoxicefalosporina C de acuerdo
con el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un me-
dio de producción que tiene la siguiente composición:

20

Productos de recuperación de desperdicios (Nadrisol)	5,00 g.
Harina de Soja (Nutrisoy 200 D)	5,00 g.
Harina de Cacahuete	5,00 g.
Melazas Residuales	5,00 g.
Harina de avena	5,00 g.
Glicerol	10,00 g.
Agua del grifo	1 litro

25

y utilizando en lugar de un agitador giratorio un agitador
recíproco que funciona a 108 carreras por minutos.

EJEMPLO 3

30

PRODUCCION EN PLANTA PILOTO DE LA DEACETOXICEFALOSPORINA C

A un fermentador de acero inoxidable con una ca-

1 pacidad de 40 litros se agregan 24 litros de un medio que
 tiene la siguiente composición:

5	Antifoam A (un agente con- tra la formación de es- puma vendido por la Dow Corning)	0,20 g.
	Glucosa	5,00 g.
	Dextrina 700	50,00 g.
	Gránulos de Soja	25,00 g.
	Melazas residuales	3,00 g.
10	Bifosfato de potasio	0,25 g.
	Carbonato de calcio	2,50 g.
	Agua del grifo fría	hasta 25 litros

15 El pH inicial es de 6,5 y no se ajusta. El medio se esteri-
 liza durante 30 minutos a una temperatura de 120°C., se en-
 fría y después se inocular con una sustancia inocularante ve-
 getativa al cinco por ciento producida como en el Ejemplo
 6. La fermentación se lleva a cabo a una temperatura de
20 30°C., durante 66 horas, se ventila con aire estéril al ré-
 gimen de 0,35 v./v./min., y se agita por medio de un agita-
 dor mecánico que funciona a 420 revoluciones por minuto. El
 pH final es de 7,5.

25 Aproximadamente 60 litros de caldo obtenido como
 se describió anteriormente se filtran con la ayuda de un
 Muflo Super-cel (una tierra diatomácea vendida por la
 Johns-Manville Products Corporation). El filtrado de caldo
 se pasa sobre una columna de 9,6 x 150 cm. empacada con
 carbón (Pittsburgh CAL. 12 x 40 vendida por la Pittsburgh
30 Activated Carbon Co.). La columna se lava con agua hasta
 que el efluente queda sin color, y la actividad que se ab-
 sorbe en el carbón se elimina pasando acetona acuosa al 50

1 por ciento sobre la columna. Las fracciones que contienen
la actividad se combinan, se concentran al vacío para elimi-
nar la acetona, y se aplican a una columna de 5,9 x 104 cm.
empacada con resina IRA-68 (ciclo de formato) (una resina de
5 intercambio aniónico vendida por la Rohm and Haas Co., y
subsecuentemente se lava con ácido fórmico para convertir
la resina al ciclo de formato). La columna se lava con agua
hasta que el efluente es claro e incoloro, y la actividad
se remueve lavándola con una solución de formato de amonio.
10 0,1M. Las fracciones activas se combinan, y se pasan sobre
una columna de carbono de 4,3 x 72 cm. (Pittsburgh CAL. 12
x 40). La columna se lava con seis volúmenes en columna de
agua, y la actividad se eluye con acetonitrilo acuoso al 30
por ciento. Las fracciones activas se combinan, se concen-
15 tran al vacío para eliminar el acetonitrilo, y se secan por
congelación. El rendimiento es de 25-30 gramos de sólidos.

La preparación secada por congelación se disuelve
en una cantidad mínima de agua y se aplica a una columna
de 7,2 x 60 cm. empacada con un producto de celulosa micro-
20 cristalina (Avicel, vendido por la FMC Corporation), se sus-
pende en acetonitrilo acuoso al 70 por ciento y se lava con
acetonitrilo antes de la adición de la muestra activa. Des-
pues de la aplicación de la muestra, la columna se lava con
un volumen en columna de acetonitrilo, y la actividad se
25 eluye con metanol. Las fracciones activas se combinan y se
concentran hasta aproximadamente 200 mililitros, y la acti-
vidad se precipita mediante la adición de 10 volúmenes de
acetona. El precipitado se filtra, se lava con acetona, y
se seca al vacío. El rendimiento es de 9-12 gramos.

30 Veinte gramos del material obtenido como se descri-

1 bió anteriormente se disuelven en una cantidad mínima de
agua y se aplica a una columna de gel de sílice (7,2 x 60
cm.). El gel de sílice (Calidad 950 producido por la
5 Davison Chemical) se lava previamente con agua, después con
metanol, y se suspenden en acetonitrilo al 70 por ciento pa-
ra empacar la columna. Después de la aplicación de la mues-
tra, la columna se lava con un volumen en columna de aceto-
nitrilo, y la actividad se eluye con acetonitrilo al 70 por
10 ciento. Se recogen fracciones múltiples y alícuotas peque-
ñas de las mismas se vierten sobre cromatogramas de papel
para la identificación del factor antibiótico presente en ca-
da fracción. El antibiótico conocido A-16884 (la 7-metoxi-
cefalosporina C) se separa de la columna en las primeras
fracciones, mientras que la deacetoxicefalosporina C se re-
15 coge en las últimas fracciones. Todas las fracciones que
mostraron mediante cromatografía en papel contener solamente
la deacetoxicefalosporina C se combinan y se secan por conge-
lación.

20 La preparación liofilizada que se obtiene por me-
dio del aislamiento y purificación anteriores es la de-
acetoxicefalosporina C sustancialmente pura en la forma de
la sal de amonio.

EJEMPLO 4

25 AISLAMIENTO DE LA DEACETOXICEFALOSPORINA C COMO LA SAL DE
MONOSODIO

30 Aproximadamente 60 litros de caldo, obtenido como
se explicó en el Ejemplo 2, se filtran con la ayuda de un
Hyflo-Super-cel. El filtrado de caldo se pasa sobre una

1 columna de 9,6 x 150 cm. empacada con carbono (Pittsburgh
CAL. 12 x 40). La columna se lava con agua hasta que queda
incolora, y la actividad absorbida se elimina pasando aceto-
5 na acuosa al 50 por ciento sobre la columna. Las fraccio-
nes que contienen la actividad se combinan, se concentran al
vacío para eliminar la acetona, y se aplican a una columna
de 5,9 x 104 cm. empacada con IRA-68 (ciclo de acetato).
La columna se lava con agua hasta que el efluente es claro
e incoloro, y la actividad se elimina mediante lavado con
10 acetato de sodio 0,1M. Las fracciones activas se combinan,
y se pasan sobre una columna de 4,3 x 72 cm. empacada con
Pittsburgh CAL. (12 x 40) carbono. La columna se lava con
seis volúmenes en columna de agua, y la actividad se eluye
con acetona acuosa al 30 por ciento. Las fracciones acti-
15 vas se combinan, se concentran al vacío para eliminar la ace-
tona, y se secan por congelación. Rendimiento de 20-30 gra-
mos. El análisis muestra 2,5 por ciento de sodio.

La mezcla antibiótica cruda como las sales de so-
dio se cromatografían sobre celulosa de microcristalina
20 (Avicel) y posteriormente la sal de monosodio de la deace-
toxicefalosporina C se separa de la mezcla de sales sobre
gel de sílice siguiendo los procedimientos de separación
cromatográfica empleados en el Ejemplo 3 para el aislamiento
de la sal de amonio de la deacetoxicefalosporina C.

25 El producto se puede distinguir cromatográfica-
mente de la deacetoxicefalosporina C preparada por medio de
la hidrogenación de la cefalosporina C (Patente de los Esta-
dos Unidos N° 3.124.576). El producto tiene las siguientes
propiedades:

30

1

Análisis elemental para: $C_{14}H_{18}N_3O_6Na$:

Teoría: C, 44,32; H, 4,78; N, 11,08;
S, 8,45

5

Encontrado: C, 44,80; H, 5,34; N, 11,74;
S, 7,88.

Espectro de absorción infrarroja (mull) $1755^{-1}cm$.
para el carbonilo de beta-lactama.

Espectro de absorción ultravioleta (H_2O)

10

Lambda max 260 m μ (epsilon 5800)

Titulación Potenciométrica (66 por ciento de DMF):

pH inicial de 5,0

pKa a 4,0, 5,8 y 10,6.

15

Espectro de resonancia magnética nuclear (D_2O):
5,60 (1H, d, J = 4,5), 5,14 (1H, d, J = 4,5), 3,98 (1H, m).
3,65 (1H, d, J=18), 3,33 (1H, d, J=18 Hz), 2,55-2,35 (2H,
m); 2,06 (3H, s), y 2,15-1,55 delta (4H, m). En los datos
anteriores de la resonancia magnética nuclear s = singlete,
d = doblete y m = multiplete.

20

EJEMPLO 5

PREPARACION DEL ACIDO LIBRE DE LA DEACETOXICEFALOSPORINA C

25

La sal de monosodio de la deacetoxicefalosporina
C preparada como se describió en el Ejemplo 4, se disuelve
en agua destilada y la resina de piliestireno sulfonada AG
50W-X4 (Bio-Rad Laboratories) se agrega a la solución en pe-
queñas porciones con agitación hasta que el pH de la mezcla
se ajusta a un pH de 2,5. La resina después se filtra y el
30 filtrado se liofiliza para obtener el ácido libre de la

1 deacetoxicefalosporina en forma de un sólido amorfo seco.

EJEMPLO 6

5 PRODUCCION DE LA DEACETOXICEFALOSPORINA C CON S. CLAVULIGERUS

NRRL 3585

Se produce un cultivo esporulado de Streptomyces Clavuligerus NRRL 3585 desarrollando el organismo en un cultivo de agar nutritivo que tiene la siguiente composición:

10

Dextrina 10,00 g.

Extracto de levadura 1,00 g.

Caseina hidrolizada
("Amina N-Z-Tipo A",
Sheffield Chemical
Company) 2,00 g.

15

Extracto de Carne 1,00 g.

Agar Meer (lavado
tres veces) 20,00 g.

Agua desionizada 1 litro

20

El pH del medio se ajusta a un pH de 7,0 mediante la adición de hidróxido de sodio.

El cultivo de agar se inocula con esporas de Streptomyces clavuligerus NRRL 3585 y se incuba durante 4-6 días a una temperatura de 30°C. El cultivo de agar después se cubre con agua destilada estéril y se raspa suavemente para recoger las esporas y células en forma de una suspensión acuosa del mismo. Un mililitro de la suspensión resultante se utiliza para inocular cada porción de 100 ml. de un medio vegetativo que tiene la siguiente composición:

25

30

Glucosa 15,00 g.

Harina de soja 15,00 g.

1	Sólidos de infusión de maiz	5,00 g.
	Carbonato de calcio	2,00 g.
	Cloruro de sodio	5,00 g.
5	Agua desionizada	1 litro

El pH del medio vegetativo se ajusta a un pH de 6,7 por medio de la adición de hidróxido de sodio.

10 La sustancia inculante vegetativa se agita durante 24-48 horas a una temperatura de 30°C., en un agitador recíproco con una carrera de dos pulgadas (5,08 cm) a 108 rpm. La sustancia inculante así preparada después se utiliza en la producción de la deacetoxicefalosporina C como sigue:

15 A un fermentador de acero inoxidable con una capacidad de 40 litros se agregan 24 litros de un medio que tiene la siguiente composición:

	Antifoam A (un agente contra la formación de espuma vendido por la Dow Corning Company)	5,00 g.
20	Almidón	1125,00 g.
	Nadrisol	125,00 g.
	Gránulos de harina de Soja	500,00 g.
	Glicerol	187,50 g.
	Amina N-Z A	125,00 g.
25	Heptahidrato de sulfato ferroso	2,50 g.
	Agua del grifo fría	hasta 24 litros

30 El pH inicial es de 5,9 y se ajusta a un pH de 6,5 con aproximadamente 20 ml. de hidróxido de sodio 5N. El medio se esteriliza durante 30 minutos a una temperatura de 120°C., y a una presión manométrica de 15-18 libras/pulgada²

1 (10,546-12,655 kg/cm²), se enfría, y después se inocula con
cinco por ciento en volumen de la sustancia inoculante ve-
getativa. La fermentación se lleva a cabo a una temperatu-
ra de 30°C., durante 66 horas, se ventila con aire estéril
5 al régimen de 0,35 v./v./min., y se agita por medio de un
agitador mecánico que funciona a 420 revoluciones por minu-
to. El pH final es de 6,3.

10 Aproximadamente 75 litros del caldo completo, ob-
tenido por medio de la combinación del caldo completo de
tres fermentaciones llevadas a cabo como se describió en lo
que antecede, se filtran con la ayuda de un Hyflo Super-cel
(una tierra diatómácea vendida por Johns-Manville Products),
5 gramos por 100 mililitros. El filtrado de Caldo se pasa
sobre una columna de 9,5 x 130 cm. empacada con 8 litros de
15 carbono (Pittsburgh CAL. 12 x 40), al régimen de 60 ml. por
minuto. La columna se lava con 10 litros de agua desioni-
zada (pH de 5,2) y la actividad absorbida en el carbono se
elimina pasando acetona acuosa al 50 por ciento sobre la
columna. Las fracciones que contienen la actividad antibió-
20 tica se combinan, se concentran al vacío para eliminar la
acetona, y se aplican a una columna de 9,5 cm. x 140 cm.
empacada con Dowex 1-X1 (una resina de intercambio iónico basi-
ca fuerte vendida por la Dow Chemical Co.), en el ciclo de for-
mato. La columna se lava con 10 litros de agua desionizada,
25 y la actividad se elimina con formato de amonio 0,1M. Las
fracciones activas se combinan, y se pasan sobre una colum-
na de 9,5 cm. x 100 cm. empacada con carbono (Pittsburgh
CAL. 12 x 40), al régimen de 60 ml. por minuto. La columna
se lava con agua; y la actividad después se eluye con 1:4
30 de acetona:agua a 60 ml. por minuto, produciendo 15 fraccio-

1 nes de dos litros, y posteriormente con 1:1 acetona:agua, produciendo 18 fracciones de un litro. Las fracciones activas se combinan, se concentran al vacío para eliminar la acetona, y se liofilizan.

5 Cuarenta gramos de las preparaciones liofilizadas combinadas, cada preparación como se discutió anteriormente, se extraen con cuatro litros de metanol agitándolos magnéticamente durante 16 horas; los materiales insolubles de metanol se filtran y la porción soluble de metanol se precipita con 5 volúmenes de acetona. El precipitado se separa mediante filtración y se seca. Rendimiento de 20,6 gramos.

10 Esta preparación se disuelve en una cantidad mínima de agua y se aplica a una columna de 5,8 cm. x 120 cm. empacada con dextrano (Sephadex G-25) al régimen de 1 ml. por minuto. La actividad se eluye con agua desionizada, y las fracciones activas se combinan y se liofilizan.

15 Diez gramos del material obtenido como se describió se disuelven en 256 ml. de acetonitrilo:agua (55:45) y se aplican a una columna de 5,5 cm. x 85 cm. empacada con gel de sílice preparado en un solvente de acetonitrilo:agua (7:3). La aplicación se efectúa a un régimen de 3 ml. por minuto. Después de la aplicación de la muestra, la columna se eluye con acetonitrilo:agua (7:3) a un régimen de flujo de 5 ml. por minuto. Las fracciones más activas se combinan, se concentran hasta sequedad al vacío, y se liofilizan.

20 Cincuenta gramos de la mezcla antibiótica liofilizada anterior, preparada combinando material de varias pruebas llevadas a cabo como se describió anteriormente, se disuelven en 80 ml. de agua y la solución se absorbe en celulosa microcristalina (Avicel). La mezcla se seca y des-

25

30

1 pués se aplica a una columna de 7,4 x 115 cm. empacada con
Avicel en acetonitrilo: n-propanol:agua (1:1:0,5, v:v:v).
La columna se eluye con el mismo sistema solvente a un ré-
gimen de 18 ml. por minuto. Fracciones de un litro de elua-
5 to se recogen y todas las fracciones que contienen deaceto-
xicefalosporina C, como se demuestra por medio de cromato-
grafía en papel mediante análisis microbiológico, se combi-
nan, se concentran bajo presión reducida y el concentrado
se liofiliza para producir la sal de anionio de la deacetoxi-
10 cefalosporina sustancialmente pura.

Doce gramos del producto secado por congelación
se purifica adicionalmente en la siguiente forma. El ma-
terial se disuelve en 75 ml. de agua y la solución se apli-
ca a una columna de 3,0 x 70 cm. empacada con resina de
15 Amberlite XAD-4 preparada en agua. El producto se eluye
con agua a un régimen de 2,5 ml. por minuto mientras que se
recogen fracciones múltiples de eluato de 20 ml. cada una.
Las fracciones de eluato se observan por medio de cromato-
grafía en papel y análisis microbiológico. Aquellas frac-
20 ciones que contienen la deacetoxicefalosporina C se combinan
y se liofilizan para producir la deacetoxicefalosporina C
con una pureza mayor. Las propiedades del producto son las
mismas que aquellas del producto del Ejemplo 4.

25 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

30 1.- Un procedimiento para producir la deacetoxi-
cefalosporina C, caracterizado por cultivar en un medio de

1 cultivo nutritivo acuoso que contiene fuentes asimilables
de carbono, nitrógeno, y sales inorgánicas bajo condiciones
de fermentación aeróbica sumergida, un estreptomiceto selec
5 cionado del grupo que consiste en Streptomyces Lipmanii -
NRRL 3584 y Streptomyces clavuligerus NRRL 3585 hasta que
se produce una cantidad sustancial de actividad antibiótica
por medio de dicho estreptomiceto en el citado medio de cul
tivo, y aislar la desacetoxicefalosporina C de dicho medio
de cultivo.

10 2.- El procedimiento de la Reivindicación 1, ca-
racterizado en que el estreptomiceto es S. lipmanii NRRL
3584.

15 3.- El procedimiento de la Reivindicación 1, ca-
racterizado en que el estreptomiceto es S. clayuligerus NRRL
3585.

4.- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DESACETOXICEFALOS-
PORINA C.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva, que consta de treinta y cinco
páginas mecanografiadas.

Madrid, 3 de Diciembre de 1.974

BERNARDO UNGRIA

D.P.

25

30