



ESPAÑA

19 ES	11	NUMERO	10 A 1
	21	436.766	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		18.4.75	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		29 FECHA	10
31 NUMERO	17410/74	20 abril 1974	británicas.
	27715/74	21 junio 1974	
	43651/74	9 octubre 1974	
	53525/74	11 diciembre 1974	
37 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
34 TITULO DE LA INVENCION			
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SAL DE ACIDO CLAVALANICO.			
71 SOLICITANTE (S)			
BEECHAM GROUP LIMITED.			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE			
Beecham House, Great West Road, BRENTFORD, Middlesex, Inglaterra.			
72 INVENTOR (ES)			
Martin Cole; Thomas Trevor Howarth; Christopher Reading, todos de nacionalidad británica.			
73 TITULAR (ES)			
El mismo solicitante.			
74 REPRESENTANTE			
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.			

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

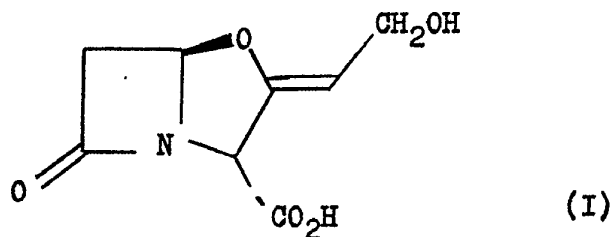
1

## RESUMEN DE LA INVENCION

5

Se ha aislado un nuevo agente antibacterialmente activo a partir del Streptomyces clavuligerus. Este nuevo compuesto, que hemos denominado ácido clavulánico, responde a la fórmula (I):

10



15

Además de ser un antibiótico de amplio espectro de potencia mediana, el ácido clavulánico y sus sales y ésteres poseen la habilidad de aumentar la eficacia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos contra muchas bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa.

20

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25

a. El Streptomyces clavuligerus ha sido descrito con detalle por Higgins y colaboradores, Int. J. Systematic Bacteriology, 21, 326 (1971). Este estreptomicetes tenía interés porque producía ciertos antibióticos  $\beta$ -lactámicos tales como penicilina N, ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico y ácido 7-(5-amino-5-carboxivaleramido)-3-carbamoiloximetil-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico. El estreptomicetes ha sido depositado en la Agricultural

1 Research Service Collection como NRRL 3585 y en la  
American Type Culture Collection como ATCC 27064.  
El Streptomyces clavuligerus también ha sido citado  
en la patente estadounidense nº 3.770.590 y también  
5 por Nagarajan y colaboradores, J. Amer. Chem. Soc.,  
93, 2308 (1971), Bramon y colaboradores, Antimicrob.  
Agents Chemother., 1, 237 (1972) y Antimicrob. Agents  
Chemother., 1, 247 (1972) e Higgens y colaboradores,  
J. Antibiotics, 27, 298 (1974).

10 b. Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que abren el anillo de  
 $\beta$ -lactama de las penicilinas y cefalosporinas para dar  
productos que están desprovistos de actividad antibac-  
teriana. Estos enzimas son producidos por muchas bacte-  
rias, principalmente las especies o cepas de Escherichia,  
15 Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Enterobacter y  
Staphylococcus y en muchos casos son la explicación de  
la resistencia de ciertas cepas de estos organismos a  
algunas penicilinas y cefalosporinas. La importancia  
de la producción de  $\beta$ -lactamasa puede ser comprendida  
20 cuando se observa que una gran proporción de organis-  
mos clínicamente aislados producen  $\beta$ -lactamasas [véase,  
por ejemplo, M. Wilson e I.A. Freeman, Bacteriological  
Proceedings, 80 (1969) donde, en un artículo titulado  
25 "Penicillin Inactivation by Gram-negative Bacilli"  
demuestran que el 84 % de los organismos gram-negativos

1 aislados en un hospital americano producían  $\beta$ -lactama  
sa]. En muchos casos, algunas penicilinas o cefalosporinas son ineficaces en el tratamiento de enfermedades atribuídas a organismos no productores de  $\beta$ -lactamasa  
5 debido a la aparición común de una co-infección por un producto de  $\beta$ -lactamasa [véase, por ejemplo, R. May y colaboradores; Brit. J. Dis. Chest., 66, 185 (1972)]. Cabe esperar que la combinación de una sustancia inhi-  
bidora de la  $\beta$ -lactamasa con una penicilina o cefalosporina proteja a estas últimas de la degradación por  
10 la  $\beta$ -lactamasa bacteriana y con ello aumente su actividad antibacteriana contra muchos organismos infecciosos. Este proceso de potenciación de la actividad antibacteriana es denominado sinergismo cuando la actividad antibacteriana de la combinación es muy superior  
15 a la simple adición de las actividades de las dos sustancias separadas. El componente inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa de la mezcla se denomina sinergista y estas sustancias son valiosas para aumentar la actividad antibacteriana de las penicilinas y de las cefalosporinas  
20 contra los organismos resistentes. Uno de los objetos de esta invención es proporcionar estos sinergistas.  
c. Ya se han descrito en la bibliografía ejemplos del uso de ciertas penicilinas y cefalosporinas semi-sintéticas  
25 resistentes a la  $\beta$ -lactamasa como inhibidores de la

1             $\beta$ -lactamasa y sinergistas para penicilinas y cefalos-  
porinas; véase, por ejemplo Sutherland y colaboradores,  
Nature, 201 868 (1964); Sabath y colaboradores, Nature,  
204, 1066 (1964); O'Callaghan y colaboradores,  
5            Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1968, 67 (1969).  
Sin embargo, ninguno de estos agentes conocidos ejer-  
ce un efecto espectacular sobre el espectro del otro  
antibiótico presente en la mezcla.

10            d. Algunos cultivos de actinomicetes han sido descritos  
como productores de sustancias inhibitoras de la  $\beta$ -lac-  
tamasa que actúan sinérgicamente con las penicilinas o  
cefalosporinas, por ejemplo los cultivos descritos en  
la patente británica nº 1.363.075 y los descritos por  
Hata y colaboradores, J. Antibiotics, 25 473 (1972) y  
15            Umezawa y colaboradores, J. Antibiotics, 26, 51 (1973).  
Ninguno de estos inhibidores de  $\beta$ -lactamasa de origen  
actinomicetal han encontrado todavía utilización clí-  
nica. Algunas características especialmente notables  
que distinguen al ácido clavulánico y a otros inhibi-  
dores de  $\beta$ -lactamasa de origen actinomicetal son su  
20            posibilidad de extracción en disolventes orgánicos a  
partir del filtrado del cultivo a pH 2, su gran esta-  
bilidad en la sangre humana y su amplio espectro de  
actividad antibacteriana e inhibidora de la  $\beta$ -lactama-  
sa, su bajo peso molecular y sus altos valores  $R_f$  en  
25

1 cromatografía de papel utilizando diversos sistemas  
disolventes.

#### DESCRIPCION DEL INVENTO

5 Hemos descubierto que el cultivo aerobio de  
Streptomyces clavuligerus en medios nutrientes conven-  
cionales a unos 25-30°C, bajo condiciones aproximadamen-  
te neutras, produce una sustancia inhibidora de la β-lac-  
tamasa que también posee actividad antibacteriana. Hemos  
denominado a este nuevo material "ácido clavulánico".

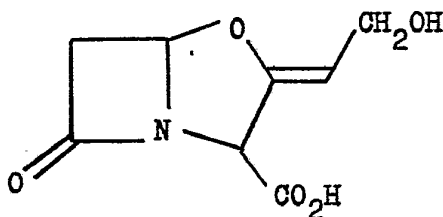
10 El ácido clavulánico tiene las siguientes propie-  
dades:

- (a) Es un ácido carboxílico.
- (b) Forma una sal sódica que tiene un espectro infrarrojo  
característico esencialmente como el mostrado en la  
15 Fig. 1.
- (c) Es capaz de inhibir el crecimiento de cepas de  
Staphylococcus aureus.
- (d) Es capaz de sinergizar el efecto antibacteriano de la  
ampicilina contra las cepas productoras de β-lactama-  
sa de Escherichia coli, Klebsiella aerogenes y  
20 Staphylococcus aureus.
- (e) Es capaz de sinergizar el efecto antibacteriano de la  
cefaloridina contra las cepas productoras de β-lacta-  
masa de Proteus mirabilis y Staphylococcus aureus.
- 25

1 (f) Forma un éster metílico que tiene un peso molecular  
(por espectroscopía de masas) de 213,0635 que corres-  
ponde a la fórmula  $C_9H_{11}NO_5$ .

5 Por lo tanto, el ácido clavulánico puede ser con-  
siderado como un ácido carboxílico monobásico de fórmula  
 $C_8H_9NO_5$ , que en forma de su sal sódica tiene un espectro  
de absorción infrarrojo característico esencialmente como  
el mostrado en la Fig. 1.

10 El compuesto producido por Streptomyces clavuli-  
gerus que tiene las propiedades anteriores responde a la  
fórmula (II):

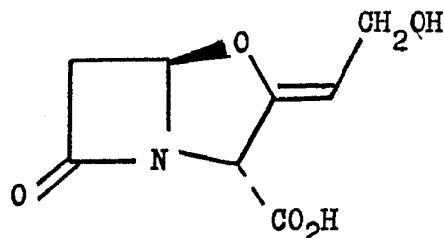


(II)

15 Así, el ácido clavulánico puede ser denominado  
ácido 3-( $\beta$ -hidroxietyliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicclo-  
[3,2,0]heptano-2-carboxílico.

20 La estereoquímica en  $C_5$  y  $C_2$  del ácido clavulá-  
nico es la misma encontrada en las penicilinas y cefalos-  
porinas naturales de manera que el ácido clavulánico pue-  
de ser representado por la fórmula estructural (I):

25



(I.)

Por lo tanto, un nombre químico más completo del ácido clavulánico es ácido Z-(2R,5R)-3-(β-hidroxietiliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo [3,2,0]heptano-2-carboxílico.

10 La gran utilidad del ácido clavulánico puede ser fácilmente apreciada cuando se observa que ciertas cepas de Klebsiella aerogenes A, cuyo desarrollo no es inhibido por la presencia de 125 µg/ml de ampicilina, amoxicilina, carbomicilina o bencilpenicilina o por la presencia de 10 µg/ml de ácido clavulánico, son inhibidas por la presencia de menos de 12,5 µg/ml de las penicilinas anterior-  
 15 mente mencionadas cuando también hay presentes 5 µg/ml de ácido clavulánico. Se han observado resultados similares para combinaciones que contienen diversos ésteres del ácido clavulánico. Por ejemplo, las cepas de Klebsiella  
 20 aerogenes A, cuyo crecimiento no es inhibido por 125 µg/ml de ampicilina o por 10 µg/ml de éster metílico de ácido clavulánico, son inhibidas por menos de 12,5 µg/ml de ampicilina en presencia de 5 µg/ml del éster metílico del ácido clavulánico. También se ha encontrado que las cepas  
 25 de Staphylococcus aureus Russell, cuyo crecimiento no es

1 inhibido por la presencia de 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina o  
por 5  $\mu\text{g/ml}$  de ácido clavulánico, son inhibidas por la  
presencia de menos de 10  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina en presen-  
cia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de ácido clavulánico. En los ensayos en  
5 ratones hembras, se ha encontrado que los niveles en san-  
gre y en tejidos de ácido clavulánico considerablemente  
superiores a 5  $\mu\text{g/ml}$  pueden ser fácilmente alcanzados por  
administración subcutánea de 100 mg/kg de la sal sódica  
del ácido clavulánico y que pueden obtenerse niveles úti-  
les de ácido clavulánico después de la administración  
10 oral de 100 mg/kg de la sal sódica de dicho ácido.

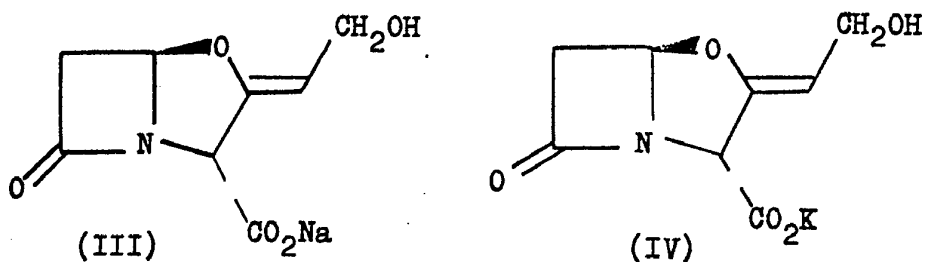
Por consiguiente, esta invención proporciona áci-  
do clavulánico como el descrito anteriormente y sus sa-  
les y ésteres.

15 En el caso más adecuado, las sales de ácido cla-  
vulánico serán sales farmacéuticamente aceptables como  
las de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, amo-  
nio y amonio sustituido tales como las sales de trimetil-  
amonio, benzatina, procaína y similares convencionalmente  
20 formadas con las penicilinas o las cefalosporinas. Las sa-  
les no farmacéuticamente aceptables y el ácido clavulánico  
también están incluidas dentro de los límites de esta in-  
vención ya que son intermediarios útiles en la preparación  
de ésteres de ácido clavulánico; por ejemplo, las sales de  
25 litio o plata del ácido clavulánico pueden reaccionar con

1 bromuro de bencilo para formar el útil éster bencílico  
del ácido clavulánico.

Las sales del ácido clavulánico suelen ser más  
estables que el ácido libre propiamente dicho y, por lo  
tanto, constituyen un aspecto favorecido de esta inven-  
5 ción. Son sales especialmente adecuadas del ácido clavu-  
lánico las de sodio y potasio que responden respectiva-  
mente a las fórmulas (III) y (IV):

10



15

Las formas cristalinas de estas sales pueden con-  
tener agua de hidratación.

20

Los ésteres adecuados del ácido clavulánico son  
los derivados de alcoholes como metanol, etano, propanol,  
butanol, 2,2,2-tricloroetanol, 2,2,2-trifluoretanol, al-  
cohol bencílico, alcohol p-nitrobencílico, fenol, acetoxi-  
metanol, pivaloiloximetanol, 2-dimetilaminoetanol, y otros  
alcoholes convencionales. Diversos ésteres del ácido clavu-  
lánico son intermediarios útiles en ciertos procedimientos  
para la purificación del ácido clavulánico. Muchos ésteres  
25 del ácido clavulánico son compuestos sinérgicos útiles.

1 La actividad de estos ésteres puede ser debida a la hidrólisis del éster a 1 ácido de origen.

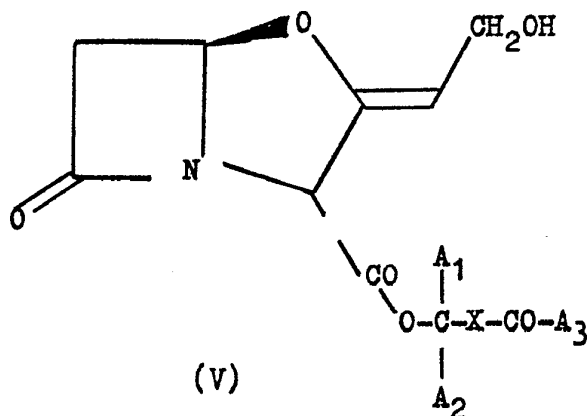
5 Cuando se utiliza aquí, el término éster incluye los ésteres derivados de un alcohol o tiol de fórmula ROH o RSH donde R es un resto orgánico. Los grupos R adecuados son alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo o otros grupos similares, cualquiera de los cuales puede estar sustituido si se desea. Con objeto de no aumentar el peso molecular hasta un grado poco razonable, normalmente 10 los grupos R no contienen más de 16 átomos de carbono, todavía mejor no más de 12 átomos de carbono y en el mejor de los casos no más de 8 átomos de carbono.

15 Preferiblemente, el grupo R es nocionalmente derivado de un alcohol ROH o (menos favorablemente) un tiol RSH que sea farmacéuticamente aceptable.

20 Los sustituyentes adecuados que pueden incluirse en el grupo R son átomos de halógeno y grupos alcoxilo inferior, hidroxilo, aciloxi inferior, alquil(inferior)amino, dialquil(inferior)amino y similares. El término "inferior" significa que el grupo contiene hasta 6 átomos de carbono y preferiblemente hasta 4 átomos de carbono. Así, por ejemplo, R puede ser un grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo lineal o ramificado, pentilo, heptilo, 25 octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, vinilo, alilo, butenilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-

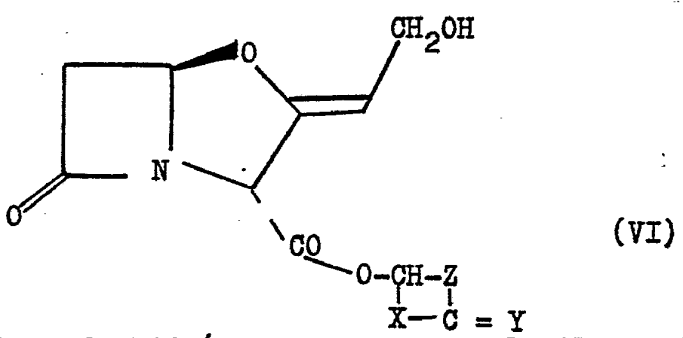
1 hexilo, cicloheptilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, me-  
 2 tilciclopentilo, metilciclohexilo, bencilo, benzohidrilo,  
 3 feniletilo, naftilmetilo, fenilo, naftilo, propinilo, to-  
 4 lilo, 2-cloroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2,2,2-trifluoroeti-  
 5 lo, acetilmetilo, benzoilmetilo, 2-metoxietilo, 2-dimetil-  
 6 aminoetilo, 2-dietilaminoetilo, 2-piperidinoetilo, 2-mor-  
 7 folinoetilo, 3-dimetilaminopropilo, p-clorobencilo, p-me-  
 8 toxibencilo, p-nitrobencilo, p-bromobencilo, m-clorobencilo,  
 9 6-metoxinaftil-2-metilo, p-clorofenilo, p-metoxifenilo o  
 10 cualquier grupo similar, así como los grupos que en el cam-  
 11 po de las penicilinas o cefalosporinas son conocidos por  
 12 producir ésteres que se sabe que son fácilmente hidroliza-  
 13 dos in vivo para formar el antibiótico de origen.

14 Los ésteres fácilmente hidrolizables comprenden,  
 15 aunque sin limitarse solamente a ellos, los de fórmulas  
 16 (V) y (VI):



1

5



10

15

donde  $A_1$  es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o aralquilo;  $A_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;  $A_3$  es un grupo alquilo, arilo o aralquilo; X es oxígeno o azufre; Y es oxígeno o azufre y Z es un grupo orgánico divalente. Los ésteres de fórmulas (V) y (VI) que liberan con bastante facilidad el ácido clavulánico a la corriente sanguínea después de la administración son aquellos donde  $A_1$  es un átomo de hidrógeno,  $A_2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo y  $A_3$  es un grupo metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo o fenilo y aquellos donde X es oxígeno, Y es oxígeno y Z es  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH=CH-$ ,

20

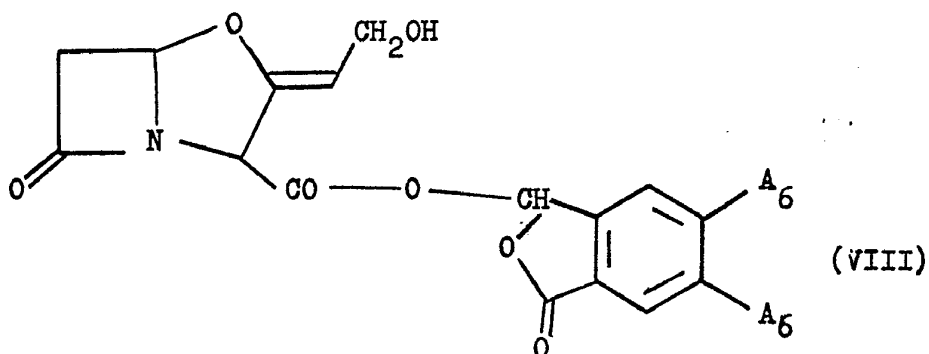
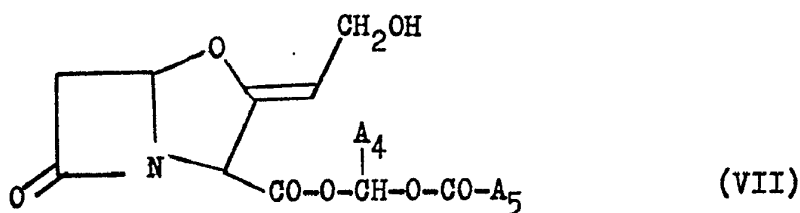


25

Cuando se utiliza en combinación con las fórmulas anteriores, el término "alquilo" incluye los grupos alquilo de hasta 6 átomos de carbono; el término "arilo" incluye los grupos fenilo, naftilo o fenilo sustituido con un sus-

1 tituyente inerte tal como un átomo de flúor o cloro o un  
 grupo metilo o metoxi o similares; cuando se utiliza aquí,  
 el término "aralquilo" significa un grupo alquilo sustitui-  
 do con un grupo arilo.

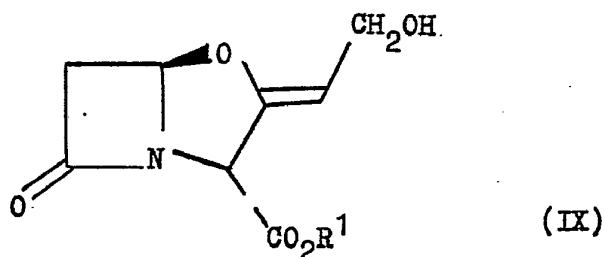
5 Son ésteres especialmente adecuados de fórmulas  
 (V) y (VI) los de fórmulas (VII) y (VIII):



20 donde A<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, A<sub>5</sub>  
 es un grupo metilo, terc-butilo o fenilo y A<sub>6</sub> es un átomo  
 de hidrógeno o un grupo metoxi.

25 Muchos ésteres del ácido clavulánico difieren de  
 los ésteres análogos de las penicilinas o cefalosporinas  
 en que presentan una mayor tendencia a hidrolizarse a áci-  
 do clavulánico bajo condiciones suaves. Así, por ejemplo,

1 los ésteres alquílicos simples como el éster metílico se  
hidrolizan lentamente a ácido clavulánico en agua regula-  
da a pH 7. Los ésteres que experimentan cierta hidrólisis  
5 bajo condiciones suaves están incluidos dentro de la fór-  
mula (IX):



10 donde R<sup>1</sup> es un grupo hidrocarbonado de 1 a 9 átomos de  
carbono opcionalmente sustituido por halógeno, alcoxi in-  
ferior, hidroxilo o grupos básicos opcionalmente salifica-  
dos de fórmula NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, donde R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o  
15 un grupo alquilo inferior, R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno o  
un grupo alquilo inferior o está unido a R<sup>2</sup> de manera que  
NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> es un anillo de 5 ó 6 miembros.

20 Cuando se utiliza con referencia a la fórmula (IX),  
el término "inferior" significa que el grupo contiene 1-4  
átomos de carbono.

25 Adecuadamente, los grupos R<sup>1</sup> incluyen grupos al-  
quilo y aralquilo opcionalmente sustituidos con halógeno,  
metoxi, hidroxilo o grupos NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> salificados, donde R<sup>2</sup> es  
un grupo metilo o etilo y R<sup>3</sup> es un grupo metilo o etilo o  
está unido a R<sup>2</sup> de manera que NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> es un grupo pirrolidino,

1 piperidino o morfolino.

Más adecuadamente, los grupos alquilo  $R^1$  son grupos de cadena lineal de hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos por un grupo metoxilo, hidroxilo o  $NR^2R^3$  salificado o un átomo de cloro, bromo o yodo o por un grupo  $CCl_3$  o  $CF_3$ .

Los ésteres del ácido clavulánico de especial utilidad como sinergistas son los que se hidrolizan en los tejidos de los mamíferos, especialmente en la sangre humana, para dar ácido clavulánico o una sal del mismo, porque se cree que el ácido clavulánico y sus sales suelen ser agentes sinersísticos algo más útiles que los ésteres. Muchos de los ésteres de fórmulas (V)-(IX) son útiles para este fin.

Otro grupo de ésteres especialmente adecuados de esta invención son los intermediarios útiles que se convierten fácilmente en ácido clavulánico o en una de sus sales por técnicas químicas o bioquímicas que son conocidas en el campo de las penicilinas o cefalosporinas por ser suficientemente suaves para no degradar a los anillos de  $\beta$ -lactama reactivos y lábiles frente a los ácidos.

El éster más adecuado es el que puede separarse por hidrogenólisis. Los ésteres convencionales para estos procesos son los ésteres bencílico, bencílico sustituido, benzohidrílico, benzohidrílico sustituido, tritílico y

1 similares. El éster bencílico ha resultado especialmente  
útil para este fin.

5 Con mucho, la naturaleza de cualquier sustituyen-  
te del radical éster carece de importancia siempre que no  
interfiera con la reacción de hidrogenolisis.

10 Como el ácido clavulánico y sus sales son inter-  
mediarios útiles en la preparación de los ésteres antibac-  
terialmente activos deseables de esta invención, la inven-  
ción proporciona también ácido clavulánico y sus sales cuan-  
do se utilizan como intermediarios químicos.

15 Como ya se ha dicho, el ácido clavulánico y sus  
sales y ésteres poseen valiosas propiedades terapéuticas.  
Por consiguiente, en otro aspecto, esta invención propor-  
ciona una composición farmacéutica que comprende ácido cla-  
vulánico o una sal o éster del mismo, junto con un vehí-  
culo farmacéuticamente aceptable.

20 Las composiciones de la invención comprenden las  
que se encuentran en una forma adaptada para uso oral, tó-  
pico o parenteral y pueden ser utilizadas para el trata-  
miento de la infección en mamíferos, incluidos los seres  
humanos.

25 Las formas adecuadas de las composiciones de esta  
invención son tabletas, cápsulas, cremas, jarabes, suspen-  
siones, soluciones, polvos reconstituibles y formas esté-  
riles adecuadas para inyección o infusión. Estas composi-

1 ciones pueden contener materiales convencionales farma-  
céuticamente aceptables, como diluyentes, ligantes, co-  
lorantes, aromatizantes, preservativos, desintegrantes y  
similares, de acuerdo con la práctica farmacéutica con-  
5 vencional, en la forma conocida por los expertos en la  
técnica de formulación de antibióticos.

Las composiciones inyectables o infusibles del  
ácido clavulánico o sus sales son especialmente adecuadas  
ya que pueden producirse altos niveles del compuesto de  
10 ácido clavulánico en los tejidos después de la administra-  
ción por inyección o infusión. Así, un aspecto preferido  
de composición de esta invención comprende el ácido cla-  
vulánico o una sal del mismo en forma estéril.

Las composiciones en forma de dosis unitaria que  
15 contienen ácido clavulánico o una sal o éster del mismo  
adaptadas para administración oral constituyen otro aspek-  
to de composición preferido de esta invención.

Bajo ciertas condiciones, la eficacia de las com-  
posiciones orales de ácido clavulánico y sus sales y és-  
20 teres puede ser aumentada si estas composiciones contienen  
un agente regulador del pH o un agente de recubrimiento  
entérico tal que los compuestos de la invención no tengan  
un contacto prolongado con los jugos gástricos altamente  
ácidos. Estas composiciones reguladas o entéricamente re-  
25 cubiertas pueden prepararse por técnicas farmacéuticas

1 convencionales.

El ácido clavulánico o sus sales o ésteres pueden estar presentes en la composición como único agente terapéutico o pueden estar junto con otros agentes terapéuticos tales como un antibiótico  $\beta$ -lactámico. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos adecuados para inclusión en estas composiciones sinérgicas son no solamente los conocidos por ser altamente susceptibles a las  $\beta$ -lactamasas sino también aquéllos que presentan un buen grado de resistencia intrínseca a las  $\beta$ -lactamasas. Así los antibióticos  $\beta$ -lactámicos adecuados para su inclusión en las composiciones de esta invención son la bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, carbenicilina, meticilina, propicilina, ampicilina, amoxicilina, epicilina, ticarcilina, ciclacilina, ácido 6-aminopenicilánico, ácido 7-aminocefalosporánico, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefoxitina, cegacetrilo, cefamandol, cefapirina, cefradina, cefaloglicina y otras penicilinas o cefalosporinas bien conocidas o pro-drogas de las mismas tales como hetacilina, metampicilina, los ésteres acetoximético, pivaloiloximético o ftalidílico de bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina o cefaloglicina o los  $\alpha$ -ésteres fenílico, toílico o indanílico de carbenicilina o ticarcilina o similares.

25 Naturalmente, si la penicilina o la cefalosporina

1 presente en la composición no es adecuada para administra-  
ción oral, entonces la composición se adaptará a la admi-  
nistración parenteral.

5 Cuando se encuentra en una composición farmacéu-  
tica junto con un antibiótico  $\beta$ -lactámico, la relación de  
ácido clavulánico o sus sales o ésteres presentes al an-  
tibiótico  $\beta$ -lactámico presente puede estar comprendida,  
por ejemplo, entre 20:1 y 1:12, mas usualmente 10:1 y ven-  
tajosamente puede ser de 3:1 a 1:3.

10 La cantidad total de agentes antibacterianos pre-  
sente en cualquier dosis unitaria estará comprendida nor-  
malmente entre 50 y 1500 mg y habitualmente será de 100 a  
1000 mg.

15 Las composiciones de esta invención pueden ser  
utilizadas para el tratamiento de infecciones, entre otras,  
del tracto respiratorio, del tracto urinario y de los te-  
jidos blandos en seres humanos.

20 Las composiciones de esta invención también pue-  
den ser utilizadas para tratar las infecciones de los ani-  
males domésticos tales como la mastitis en el ganado va-  
cuno.

25 Normalmente se administran entre 50 y 6000 mg de  
las composiciones de la invención, cada día de tratamien-  
to, pero más habitualmente se administrarán entre 500 y  
3000mg al día de la composición del invento. Sin embargo,  
para el tratamiento de infecciones sistémicas graves o de

1 infecciones de organismos especialmente intransigentes,  
pueden utilizarse dosis más altas de acuerdo con la prác-  
tica clínica.

5 La forma exacta de las composiciones de esta in-  
vención dependerá hasta cierto punto del microorganismo  
que está siendo tratado. Para el tratamiento de las casi  
todas infecciones, las composiciones de esta invención se adap-  
tan normalmente para producir un nivel máximo en sangre  
de por lo menos 0,1 µg/ml, todavía mejor de por lo menos  
10 0,25 µg/ml y preferiblemente de 1 µg/ml como mínimo de  
ácido sinergístico, por ejemplo, 2,5-5 µg/ml. de sinergístico.

15 La penicilina o cefalosporina de las composicio-  
nes sinérgicas de esta invención estará presente normal-  
mente en una cantidad igual o aproximadamente igual a la  
cantidad convencionalmente utilizada cuando la penicilina  
o la cefalosporina es el único agente terapéutico emplea-  
do en el tratamiento de la infección.

20 Las composiciones especialmente adecuadas de esta  
invención contienen de 150 a 1000 mg de amoxicilina, ampi-  
cilina o una pro-droga de las mismas y de 50 a 500 mg de  
ácido clavulánico o una sal o un éster hidrolizable in vivo  
del mismo y todavía mejor de 200 a 500 mg de amoxicilina,  
ampicilina o una pro-droga de la misma y de 50 a 250 mg  
de ácido clavulánico o una sal o éster hidrolizable in vivo  
25 del mismo.

1                    Los materiales presentes en estas composiciones  
pueden estar hidratados si es necesario. Los pesos de los  
antibióticos en esta composición están expresados sobre  
la base del antibiótico teóricamente disponible de la com-  
5                    posición y no sobre la base del peso de la pro-droga.

                  En su aspecto de procedimiento, esta invención pro-  
porciona un procedimiento para la preparación de ácido  
clavulánico y sales y ésteres del mismo, procedimiento que  
consiste en cultivar una cepa de Streptomyces clavuligerus  
10                    y recuperar el ácido clavulánico o una sal del mismo del  
medio de cultivo y después, si se desea, formar el ácido  
libre o una sal o éster por métodos conocidos.

                  Preferiblemente, se utiliza en el procedimiento  
de esta invención el Streptomyces clavuligerus ATCC 27064  
15                    o un mutante de gran rendimiento del mismo.

                  Cuando se utiliza aquí, el término "cultivo" signi-  
fica el crecimiento aerobio deliberado de un organismo pro-  
ductor de ácido clavulánico en presencia de fuentes asimi-  
lables de carbono, nitrógeno y sales minerales. Este cre-  
20                    cimiento aerobio puede tener lugar en un medio nutritivo  
sólido o semisólido o en un medio líquido en el que los  
nutrientes son disueltos o suspendidos. El cultivo puede  
tener lugar sobre una superficie aerobia o mediante culti-  
vo sumergido. El medio nutritivo puede estar constituido  
25                    por nutrientes complejos o puede ser químicamente defini-

1 do. Hemos encontrado medios que contienen nutrientes complejos tales como el extracto de levadura, harina de soja y similares que son especialmente adecuados.

5 Los medios nutrientes que pueden ser utilizados para el cultivo de Streptomyces clavuligerus pueden contener del orden de 0,1 a 10 % de una fuente compleja de nitrógeno orgánico tal como extracto de levadura, licor de infusión de maíz, proteínas vegetales, proteínas de semillas, hidrolizados de estas proteínas, hidrolizados de proteínas lácteas, extractos de pescado y carne e hidrolizados tales como peptonas. Alternativamente, pueden utilizarse fuentes de nitrógeno químicamente definidas como urea, amidas, aminoácidos comunes sólo o en mezclas, tales como valina, asparagina, ácido glutámico, prolina y  
10 fenilalanina. Pueden incluirse hidratos de carbono (0,1-5 %) en los medios nutrientes pero en ciertos medios la glucosa es indeseable porque ejerce un efecto depresor sobre el rendimiento del ácido clavulánico deseado. Pueden también utilizarse el almidón o los hidrolizados de almidón como  
15 dextrina, sacarosa, lactosa u otros azúcares o glicerol o ésteres glicerólicos. La fuente de carbono también puede derivar de aceites vegetales o grasas animales. Los ácidos carboxílicos y sus sales pueden ser incluidos como fuente de carbono para el crecimiento y producción de  
20 inhibidores de  $\beta$ -lactamasa. Un medio de bajo precio de cos

1 te, especialmente adecuado, es el que contiene harina de  
soja (Arkasoy) más solubles de destilería de malta dese-  
cados (Scotasol) más dextrina.

5 La adición de agentes antiespumantes tales como  
Pluronic L81 puede ser necesaria para controlar la forma-  
ción de espuma de ciertos medios en los fermentadores.

10 A los medios antes descritos, especialmente si  
están químicamente definidos, pueden agregarse sales mine-  
rales tales como NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> y sales Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> de ácido fosfórico; puede  
agregarse CaCO<sub>3</sub> como fuente de iones Ca<sup>++</sup> o por su acción  
reguladora del pH. También pueden incluirse sales de ele-  
mentos traza tales como níquel, cobalto o manganeso. Si se  
15 desea pueden añadirse vitaminas. Cuando se utiliza aquí,  
el término "mutante" incluye cualquier cepa mutante que  
surja espontáneamente o a través del efecto de un agente  
externo ya sea este agente aplicado deliberadamente o no.  
Los métodos adecuados de producción de cepas mutantes in-  
cluyen los indicados por H.I. Adler en Techniques for the  
20 Development of Micro-Organisms en "Radiation and Radioiso-  
topes for Industrial Micro-Organisms", Proceedings of a  
Symposium, Viena, 1973, pág. 241, Agencia Internacional  
de Energía Atómica y estos incluyen:

25 i. Radiación ionizante (tales como rayos X e  $\gamma$ ), luz ul-  
travioleta, luz ultravioleta más un agente fotosensi-

1 bilizante (tal como 8-metoxipsoraleno), ácido nitroso,  
hidroxilamina, análogos de la pirimidina base (tal co  
me 5-bromouracilo), acridinas, agentes alquilantes,  
5 (como gas de mostaza, metanosulfonato de etilo), pe-  
róxido de hidrógeno, fenoles, formaldehido, calor y  
ii. Técnicas genéticas tales como recombinación, transfor-  
mación, transducción, lisogenización, conversión liso-  
génica y técnicas selectivas para mutantes espontáneos.

10 El cultivo del Streptomyces clavuligerus normalmen-  
te tiene lugar en un intervalo de temperatura de 15-40°C,  
habitualmente 20-35°C y preferiblemente 25-30°C a un pH  
comprendido entre 5 y 8,5, preferiblemente entre 6 y 7,5.

15 El Streptomyces clavuligerus puede ser cultivado  
en los medios anteriores en matraces cónicos de vidrio,  
aireados por sacudida en un sacudidor rotatorio o en fer-  
mentadores de acero inoxidable tabicados, agitados con im-  
pulsores de disco de paletas y aireados con un rociador.  
La fermentación también puede efectuarse de forma conti-  
nua.

20 El pH inicial de la fermentación es típicamente  
7,0 y se obtiene un rendimiento máximo de ácido clavulá-  
nico en 2-10 días a 20-35°C. En un fermentador de acero  
inoxidable agitado, utilizando el medio de Arkasoy/Scota-  
sol/Dextrina descrito antes, la temperatura preferida es  
25 de 26°C y los rendimientos máximos de ácido clavulánico

1 se obtienen al cabo de 5 días.

5 El ácido clavulánico puede ser extraído del filtrado de cultivo por diversos métodos. La extracción con disolvente a partir del filtrado del cultivo frío ajustado a valores ácidos del pH y los métodos basados en la naturaleza aniónica del metabolito tal como el uso de resinas cambiadoras de anión han resultado especialmente útiles. Las células del Streptomyces clavuligerus normalmente se separan primero de la fermentación por filtración o

10 centrifugación antes de iniciar los procesos de extracción.

En el proceso de extracción con disolvente, se enfría el filtrado del cultivo y se reduce el pH a la región de pH 2-3 por adición de ácido mientras se mezcla íntimamente con un disolvente orgánico no miscible con agua tal como acetato de n-butilo, metil-isobutil-cetona, n-butanol o acetato de etilo. El ácido utilizado para reducir el pH del medio es normalmente un ácido mineral tal como clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico o un ácido similar. El n-butanol es un disolvente especialmente adecuado para uso en la extracción del filtrado de cultivo acidulado.

15 Después de separar las fases por centrifugación, el metabolito inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa es retroextraído de la fase disolvente a una solución reguladora acuosa de bicarbonato sódico o fosfato hidrógeno potásico, una suspensión

20 de  $\text{CaCO}_3$  o agua mientras se mantiene el pH aproximadamente

25

1 neutro, por ejemplo a pH 7,0. Este extracto acuoso, des-  
pués de la separación de las fases, puede ser concentrado a  
presión reducida y liofilizado para dar un preparado crudo  
de una sal de ácido clavulánico. Este preparado es estable  
5 cuando se almacena en forma de sódido seco a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En el proceso que utiliza una resina cambiadora de  
anión, el filtrado de cultivo clarificado a un pH aproxima-  
damente neutro o ligeramente ácido, por ejemplo pH 6-7 es  
percolado a lo largo de una columna de una resina cambiadora  
10 de anión básica, débil o fuerte, tal como Amberlite IR4B o  
Zerolit FFIF, respectivamente, hasta que la resina está sa-  
turada y el material inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa emerge por  
el fondo. Después la columna se lava con agua y se eluye  
con cloruro sódico acuoso. Se recogen las fracciones inhi-  
15 bidoras de la  $\beta$ -lactamasa, se reúnen, se desalifican y se  
liofilizan para dar una sal sólida cruda de ácido clavulánico.

La "Aberlita IR 4B es una ejemplo de resina básica  
debil cambiadora de anión con grupos de poliamina activos y  
matrices reticuladas a base de poliestireno-divinil-benceno.

20 La Zerolita FFIP es una resina básica fuerte cambia-  
dora de anión con grupos activos de amonio cuaternario y ma-  
trices reticuladas a base de poliestireno-divinil-benceno.  
Como resinas similares a la Zerolita FFIP se incluyen la  
Isopor FFIP y la BeAcidite FFIP SRA.64. Estas resinas son  
25 suministradas por BDH Chemicals Ltd. Poole, Dorset, U.K.

1           Una forma alternativa del proceso de extracción con-  
siste en poner en contacto el filtrado de cultivo (habitual-  
mente a pH aproximadamente neutro) que contiene una sal del  
ácido clavulánico con una fase orgánica en la que está di-  
5           suelta una amina insoluble en agua. Los disolventes orgáni-  
cos adecuados son disolventes polares convencionales no mis-  
cibles con agua tales como metil-isobutil-cetona, tricloroe-  
tileno y similares. Las aminas adecuadas son aminas secunda-  
rias o terciarias en las que uno de los grupos sustituyentes  
10           es un grupo alifático de cadena larga, por ejemplo de 12-16  
átomos de carbono y el otro es un grupo terc-alquilo de forma  
que la molécula sea lipofílica. El Amberlite LA2 ha resulta-  
do una amina muy útil. Normalmente la amina se utiliza en  
forma de su sal de adición de ácido.

15           Después de este proceso de extracción, el ácido cla-  
vulánico se encuentra en la fase orgánica en forma de sal  
aminica. La fase orgánica se separa después del filtrado de  
cultivo. El ácido clavulánico puede ser retroextraído a  
una fase acuosa por retroextracción con una solución salina,  
20           preferiblemente una solución concentrada de cloruro sódico  
con un nitrato sódico o similares. La sal cruda de ácido cla-  
vulánico puede ser obtenida después por liofilización o similar.

25           Otros métodos primarios de aislamiento que pueden  
ser utilizados son los métodos convencionales tales como ad-  
sorción sobre carbón, precipitación, desplazamiento salino

1 y filtración molecular pero estos métodos no son habitual-  
mente tan adecuados como los métodos antes descritos que  
son los preferidos.

5 Puede conseguirse una nueva purificación de los  
sólidos crudos obtenidos por los métodos descritos mediante  
diversos métodos pero la cromatografía en columna cambia-  
dora de ión es especialmente adecuada, en especial cuando se  
utiliza Isopor, De-Acidite FFIP SRA64 o celulosa DEAE. La  
columna de DeAcidite puede ser eluida con gradiente de so-  
lución acuosa de una sal tal como cloruro sódico (0-0,5 M).  
10 La columna de celulosa DEAE en solución reguladora de fosfa-  
to 0,01 M a pH 7 puede ser eluida con una solución salina,  
normalmente una solución de NaCl (NaCl 0-0,2 M en solución  
reguladora de fosfato 0,01 M a pH 7). Las fracciones activas  
15 pueden ser detectadas por su actividad inhibitoria de la  
 $\beta$ -lactamasa y su actividad antibacteriana contra Klebsiella  
aerogenes en un ensayo de difusión en agar. Las fracciones  
que contienen la mayor parte de esta actividad se combinan  
después y se concentran hasta pequeño volumen bajo vacío.  
20 Este preparado crudo de la sal de ácido clavulánico se de-  
salifica percolándolo a través de una columna de Bio Gel P2,  
(el Bio Gel P2 es un ejemplo o una resina altamente lipofili-  
ca sobre la cual pueden ser absorbidos materiales organicos  
pero que no retiene sales inorganicas. El Bio Gel P2 es un  
25 gel de poliacrilamida suministrado por Ho Rad, 32 nd and

1 Griffen Avenue, Richmond, Ca. 94804, U.S.A.). El material  
desalificado activo se concentra después, se mezcla con  
etanol y se cromatografía de nuevo sobre una columna de ce-  
lulosa empleando como disolvente una fase superior de buta-  
5 nol/etanol/agua 4:1:5 en volumen/volumen.

Las fracciones que contienen el material que inhibe  
la  $\beta$ -lactamasa de Escherichia coli se reúnen, se evaporan a  
sequedad bajo vacío, se redisuelven en agua y se liofilizan  
para dar una sal de ácido clavulánico en forma de sólido blanco.

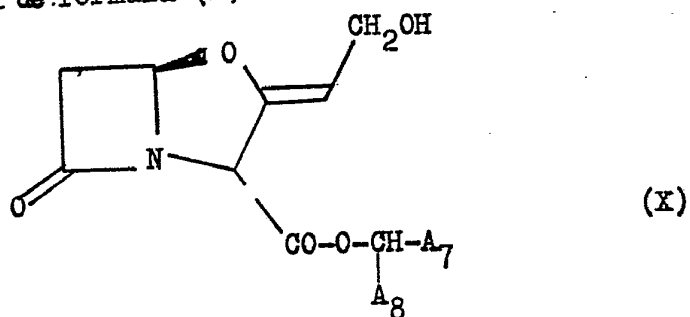
10 Hemos encontrado que los métodos más útiles para  
detectar el ácido clavulánico en los filtrados de cultivo  
son la cromatografía en papel y un sistema de detección  
bioautográfico. El ácido clavulánico puede ser determina-  
do haciendo uso de su actividad inhibidora de la  $\beta$ -lacta-  
15 masa. Puede utilizarse la cromatografía en capa fina para  
detectar el ácido clavulánico en preparados sólidos. Esta  
detección y los procedimientos de ensayo son descritos  
más adelante.

20 Una variación del procedimiento para la prepara-  
ción de una forma pura de ácido clavulánico o sus sales  
consiste en aislar una forma impura de ácido clavulánico  
o de una sal del mismo, formar un éster de ácido clavulá-  
nico en la forma convencional, purificar el éster y des-  
25 pués regenerar el ácido clavulánico o una de sus sales a  
partir del éster.

1 El ácido clavulánico o sus sales impuros, uti-  
lizados en este procedimiento contienen normalmente como  
mínimo un 1 % en peso del antibiótico.

5 Los ésteres adecuados para uso en este procedi-  
miento son aquéllos que pueden ser escindidos por hidro-  
genolisis, métodos enzimáticos o por hidrólisis en condi-  
ciones muy suaves.

Un grupo adecuado de ésteres utilizados en este  
procedimiento es el de fórmula (X):



15 donde  $A_7$  es un átomo de hidrógeno o un grupo fenilo op-  
cionalmente sustituido y  $A_8$  es un grupo fenilo opcional-  
mente sustituido.

20 En el caso más adecuado,  $A_7$  es un átomo de hidró-  
geno o un grupo fenilo, toliilo, clorofenilo o metoxifeni-  
lo y  $A_8$  es un grupo fenilo, toliilo, clorofenilo o metoxi-  
fenilo.

Preferiblemente,  $A_7$  es un átomo de hidrógeno y  $A_8$   
es un grupo fenilo.

25 Los ésteres de fórmula (X) pueden ser escindidos  
por hidrogenolisis para dar ácido clavulánico o una sal  
del mismo.

Otros grupos de ésteres que pueden ser utilizados en este procedimiento son los de fórmulas (V) y (VI) como los descritos anteriormente. Estos ésteres pueden ser convertidos en sales de ácido clavulánico por hidrólisis alcalina suave, por ejemplo a pH 7,5.

La forma impura de ácido clavulánico o sus sales que ha de ser purificada en este procedimiento puede encontrarse en forma de un sólido o una solución que habitualmente también contiene cantidades considerables de impurezas orgánicas o inorgánicas.

El ácido clavulánico o sus sales pueden ser convertidos en un éster por las reacciones de esterificación a que nos referiremos más adelante. El método preferido de formación del éster requerido del ácido clavulánico comprende la reacción de una sal de ácido clavulánico con un agente esterificante tal como un haluro reactivo, un éster sulfónico o similares, como se describirá más adelante. Frecuentemente estas reacciones se llevan a cabo en un disolvente orgánico de elevada constante dieléctrica tal como dimetilformamida, dimetilformamida/acetona, dimetilsulfóxido, N-metilacetamida, hexametilfosforamida y similares.

Si se desea, la sal del ácido clavulánico puede ser disuelta en el disolvente de forma convencional o puede ser combinada a un soporte polimérico. Los soportes adecuados para uso en este procedimiento son las resinas cambiadoras de anión básicas fuertes, especialmente las

1 que poseen un carácter macrorreticular que permite el uso  
de sistemas disolventes no acuosos. Hemos encontrado que  
el Amberlyst A26 es adecuado para este fin. La sal de áci-  
do clavulánico puede ser adsorbida sobre la resina a partir  
del filtrado de cultivo y después la resina puede ser sus-  
5 pendida en dimetilformamida conteniendo yoduro sódico o al-  
ternativamente eluída por una columna con una solución de  
yoduro sódico en dimetilformamida en una mezcla de dime-  
tilformamida y acetona.

10 Una vez formado, el éster impuro del ácido clavulá-  
nico es normalmente purificado por cromatografía. En es-  
tos procedimientos, el éster es normalmente disuelto en un  
disolvente orgánico como acetato de etilo, cloruro de me-  
tileno, cloroformo, ciclohexano o disolventes similares.  
La fase sólida utilizada en el proceso cromatográfico es  
15 normalmente un material inerte tal como gel de sílice o ma-  
teriales cromatográficamente similares.

Las fracciones que salen de la columna pueden ser  
ensayadas para determinar la presencia del ácido clavulá-  
nico, haciendo uso de sus propiedades sinérgicas. Las  
20 fracciones activas son normalmente combinadas y el disol-  
vente orgánico es evaporado a presión reducida.

El éster resultante de este procedimiento general-  
mente es de pureza aceptable pero el material puede ser  
recromatografiado si se desea.

25 Este éster purificado de ácido clavulánico puede

1 ser convertido en ácido clavulánico o en una sal del mismo  
por los métodos antes mencionados.

5 Un método especialmente adecuado de obtención de  
ácido clavulánico o sus sales es la hidrogenación de un  
compuesto de fórmula (X) como el anteriormente descrito.  
Estas reacciones normalmente tienen lugar en presencia de  
un catalizador de un metal de transición, utilizando pre-  
siones de hidrógeno bajas o medianas. La reacción puede  
10 efectuarse a temperatura alta, ambiente o baja, por ejem-  
plo entre 0 y 100°C. Unas condiciones de reacción especial-  
mente adecuadas para estas hidrogenaciones suponen una  
presión de hidrógeno ligeramente superatmosférica, aproxi-  
madamente a la temperatura ambiente (12-20°C). La reac-  
15 ción puede ser efectuada en disolventes convencionales ta-  
les como alcanoles inferiores, por ejemplo etanol. Hemos  
encontrado que un catalizador especialmente adecuado es el  
paladio sobre carbón.

20 Si la hidrogenación se realiza en presencia de una  
base, entonces se produce una sal del ácido clavulánico,  
por ejemplo se obtiene la sal sódica o potásica si la reac-  
ción se efectúa en presencia de carbonato hidrógeno sódico  
o potásico.

25 El ácido clavulánico o su sal resultante de esta  
reacción es generalmente de buena pureza.

1

## DESCRIPCION 1

### Ensayo adecuado para la detección del ácido clavulánico

#### 5 Principio del ensayo

Unas soluciones que contienen ácido clavulánico (filtrado de cultivo, muestras procedentes del proceso de aislamiento y similares) se incuban durante 15 minutos con un preparado de  $\beta$ -lactamasa en solución reguladora de fosfato 0,05 M, a pH 7 y 37°C. Durante este tiempo, se produce la inhibición o inactivación del enzima. Después se añade el substrato (bencilpenicilina) y se prosigue la incubación durante 30 minutos a 37°C. La cantidad de degradación enzimática del substrato a ácido peniciloico es determinada por el ensayo de hidroxilamina para la penicilina. La cantidad de  $\beta$ -lactamasa utilizada es suficiente para producir un 75 % de hidrólisis de la bencilpenicilina en 30 minutos a 37°C.

20

El grado de hidrólisis es un reflejo de la cantidad de enzima que permanece sin inhibir. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad enzimática por una dilución dada de la solución que contiene el ácido clavulánico (v.g. filtrado de cultivo) o

25

1 como concentración de ácido clavulánico ( $\mu\text{g/ml}$ ) que produce una inhibición del 50 % del enzima bajo las condiciones antes establecidas ( $I_{50}$ ).

#### Enzima $\beta$ -lactamasa

5 Como enzima se utiliza la  $\beta$ -lactamasa producida por Escherichia coli JT4. Este cultivo es una cepa resistente a la ampicilina y debe su resistencia a la producción de una  $\beta$ -lactamasa controlada por el factor R. Pueden utilizarse, si se desea, otras  $\beta$ -lactamasas similares controladas por el factor R.

10 El cultivo mantenido en tubos inclinados de agar nutrientes se inocular en 400 ml de medio estéril de triptona contenidos en un matraz cónico de 2 litros. Este medio tiene la siguiente composición: triptona (Oxoid) 32 g/l, extracto de levadura (Oxoid) 20 g/l; NaCl 5 g/l y

15  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,2 g/l. El pH final se ajusta a 7,4 con NaOH diluido. El matraz se sacude a  $25^\circ\text{C}$  durante 20 horas con un sacudidor rotatorio a 240 rpm.

20 Las células bacterianas se recogen por centrifugación, se lavan con solución reguladora de fosfato 0,05 M a pH 7 (resuspendidas y centrifugadas) y se vuelven a suspender en agua para dar una concentración de células 25 veces superior a la del medio de cultivo. Esta suspensión de células se rompe después en un desintegrador ultrasónico MSE a  $4^\circ\text{C}$ . Los residuos celulares se separan por cen-

25

1           trifugación y se congelan profundamente partes alícuo-  
tas del líquido sobrenadante almacenado. Para uso en el  
proceso de ensayo, el líquido sobrenadante se diluye con  
solución reguladora de fosfato 0,005 M hasta que produce  
5           una hidrólisis del 75 % aproximadamente de una solución  
de 1 mg/ml de bencilpenicilina, en 30 minutos a 37°C.

Procedimiento de ensayo

10           Unas diluciones adecuadas del preparado de inhi-  
bidor y de la solución de  $\beta$ -lactamasa se mezclan e incu-  
ban a 37°C durante 15 minutos (ensayo). También se incu-  
ba un control con regulador de pH en lugar del preparado  
de inhibidor. Después se añade la solución de bencilpeni-  
cilina (substrato) a las mezclas de ensayo y control y se  
prosigue la incubación durante 30 minutos más a 37°C. La  
15           bencilpenicilina residual en cada mezcla se estima des-  
pués utilizando el ensayo de la hidroxilamina descrito  
por Batchelor y colaboradores, Proc. Roy. Soc., B 154,  
498 (1961). Se añaden 6 ml del reactivo de hidroxilamina  
a todos los ensayos, controles y blancos y se dejan reac-  
20           cionar durante 10 minutos a la temperatura ambiente an-  
tes de la adición de 2 ml de reactivo de sulfato férrico  
amónico. La absorción de las soluciones finales se mide  
en un colorímetro E.E.I. o un espectrofotómetro a 490 nm  
25           contra el blanco de reactivo. La composición de las reac-  
ciones, ensayos y blancos antes del ensayo con hidroxil-

1 amina es la siguiente:

Componentes (todos disueltos o diluidos con solución reguladora de fosfato 0,005 M a pH7)	<u>Ensayo</u>	<u>Blanco de bencilpenicilina, ml</u>	<u>Control, ml</u>	<u>Blanco reactivo, ml</u>
5 Solución de $\beta$ -lactamasa de <u>Escherichia coli</u>	1,9	0,0	1,9	1,9
Solución de inhibidor	0,1	0,0	0,0	0,0
Bencilpenicilina, 5 mg/ml	0,5	0,5	0,5	0,0
10 Solución reguladora de fosfato 0,005 M a pH 7	0,0	2,0	0,1	0,6

Cálculo de los resultados

El porcentaje de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa se calcula como sigue:

15 Absorción del blanco de bencilpenicilina menos absorción del control (reacción no inhibida) = x

Absorción del ensayo (reacción inhibida) menos absorción del control (reacción no inhibida) = y

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{y}{x} \times 100$$

20 Para obtener el valor  $I_{50}$ , el preparado de inhibidor se diluye hasta que se obtiene en el procedimiento anterior una inhibición del 50 % de la inactivación de la bencilpenicilina por la  $\beta$ -lactamasa.

25

## DESCRIPCION 2

### Detección por cromatografía de papel del ácido clavulánico

El filtrado de cultivo de una solución de referencia de ácido clavulánico (preparado parcialmente purificado de 250 µg/ml) se deposita en gotas (20 µl/origen) sobre tiras de papel Whatman nº 1 de 1 cm de anchura. Los cromatogramas se desarrollan por cromatografía descendente durante 16 horas a 5°C, utilizando como disolvente n-butanol/isopropanol/agua 7:7:6 en volumen/volumen. Las tiras se secan a 40°C y se depositan sobre placas de agar que contienen 6 µg/ml de bencilpenicilina y se siembran con una cepa productora de β-lactamasa de Klebsiella aerogenes (sistema sinérgico). Las placas se incuban durante la noche a 30°C y el ácido clavulánico se revela como una zona de crecimiento inhibido. El valor R<sub>F</sub> de la zona es 0,46. La bencilpenicilina a una concentración de 6 µg/ml sólo se encuentra por debajo de la concentración requerida para matar a la Klebsiella aerogenes pero en presencia de un inhibidor de la β-lactamasa, esta concentración se vuelve tóxica, es decir, existe sinergismo.

El uso del sistema sinérgico anterior permite detectar el ácido clavulánico a concentraciones inferiores a las que muestra actividad antibacteriana.

### DESCRIPCION 3

#### Detección por cromatografía en capa fina de la sal sódica del ácido clavulánico

Se depositan unas soluciones de preparados de sal sódica de ácido clavulánico (5  $\mu$ l de 1 mg/ml) sobre placas de vidrio cubiertas con una capa de 0,25 mm de gel de sílice (F254), suministrado por E. Merck, Darmstadt, Alemania. Los cromatogramas se desarrollan a 22°C utilizando la fase superior de la mezcla n-butanol/etanol/agua 4:1:5 volumen/volumen. Las placas del cromatograma se secan a 40°C y la sal sódica del ácido clavulánico se localiza por bioautografía sobre placas de agar que contienen 6  $\mu$ g/ml de bencilpenicilina y sembradas con Klebsiella aerogenes (sistema sinérgico - ver la sección sobre cromatografía de papel anterior). La superficie de agar se cubre con una tela filtrante fina antes de depositar sobre ella la placa de cromatografía en capa fina. Después de dejar transcurrir 15-30 minutos para que se produzca el humedecimiento y la difusión, se levanta la placa de cromatografía en capa fina con ayuda de la tela filtrante y la placa de agar se incuba durante la noche a 30°C para revelar las zonas de crecimiento inhibido. El valor  $R_f$  de la sal sódica del ácido clavulánico en el disolvente anterior es aproximadamente 0,37. También se utilizan dos reactivos en atomización, Ehrlich y cloruro de trifenil-

1           tetrazolio, para revelar la zona de la sal sódica del áci-  
do clavulánico. El primer reactivo está constituido por  
300 mg de p-dimetilaminobenzaldehido disueltos en 9 ml de  
alcohol etílico, 54 ml de n-butanol y 9 ml de HCl concen-  
5           trado. Al calentar a 120°C durante 1-2 minutos, la placa  
de cromatografía en capa fina rociada, la sal sódica del  
ácido clavulánico aparece como una mancha rosa. El reac-  
tivo cloruro de trifeniltetrazolio está constituido por  
una mezcla de un volumen de una solución al 4 % de este  
10           compuesto en metanol con un volumen de hidróxido sódico  
metanólico. Después de rociarlas, las placas de cromato-  
grafía en capa fina se calientan a 80°C. La sal sódica  
del ácido clavulánico aparece como una mancha roja sobre  
un fondo blanco.

15

#### EJEMPLO 1

##### Cultivo de Streptomyces clavuligerus

20

El Streptomyces clavuligerus se cultiva a 26°C  
sobre tubos inclinados de agar que contienen 1 % de  
Yeatex (extracto de levadura), 1 % de glucosa y 2 % de  
agar Oxoid nº 3, pH 6,8. Se utiliza un aro estéril para  
transferir el micelio y las esporas desde el tubo incli-  
nado a 100 ml de un medio líquido contenido en un Erlen-  
meyer de 500 ml. El medio líquido tiene la siguiente com-  
posición:

25

1	Extracto de malta Oxoid	10 g/l
	Peptona bacteriológica Oxoid	10 g/l
	Glicerol	20 g/l
	Agua corriente	1 litro

5 El medio se ajusta a pH 7,0 con solución de hidróxido sódico y se dispensan volúmenes de 100 ml en matraces que son cerrados con tapones de espuma antes de tratarlos en autoclave a 15 psi (1,0 kg/cm<sup>2</sup>) durante 20 minutos. Un matraz de siembra inoculado se sacude durante 3 días a 26°C en un sacudidor rotatorio, con un recorrido de 2 pulgadas (5,1 cm) y una velocidad de 240 rpm. Los matraces de la fase de producción que contienen el medio líquido antes descrito se inoculan con un 5 % de ino-  
10 culum vegetativo y se cultivan bajo las mismas condiciones que el matraz de siembra. Unas muestras del filtrado de cultivo se analizan para observar la acción inhibidora contra la β-lactamasa de Escherichia coli JT4. Se obtiene una actividad óptima al cabo de 3 días. Los resultados se encuentran en la Tabla I. Se observa una zona de ácido clavulánico a R<sub>f</sub> 0,46 cuando el filtrado del cultivo se examina por el método de cromatografía en papel anteriormente descrito. El aumento de tamaño de la zona es paralelo al aumento obtenido en el ensayo del inhibidor de β-lactamasa.  
15  
20  
25

También se cultiva Streptomyces clavuligerus en

1           matraces sacudidos de 2 litros que contienen 400 ml de me-  
 dio (fase de producción), utilizando el mismo medio y las  
 mismas condiciones de cultivo descritas antes en este ejem-  
 plo. En estas vasijas mayores, el crecimiento del organis-  
 5           mo es más lento y se alcanza la actividad óptima inhibito-  
 ria de la  $\beta$ -lactamasa al cabo de 7-9 días después de la  
 inoculación con la siembra vegetativa. Los resultados tam-  
 bién se encuentran en la Tabla I.

TABLA I

10           Actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa del Streptomyces  
clavuligerus cultivado en matraces de 500 ml y

15	Tiempo de fer- mentación (días)	2000 ml	
		% de inhibición del <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -lactamasa a una dilución final de 1/2500 del filtrado del cultivo	
		Matraz sacudido de 500 ml	Matraz sacudido de 2000 ml
	1	15	-
	2	30	-
	3	55	-
	4	50	10
20	5	51	21
	6	57	36
	7	-	51
	8	-	53
25	9	-	50

## EJEMPLO 2

### Cultivo de Streptomyces clavuligerus

Se utiliza un matraz de siembra preparado como en el Ejemplo 1 para inocular unos matraces cónicos de 500 ml que contienen partes alícuotas de 100 ml del siguiente medio con agua desionizada:

Almidón soluble.	2 % en peso/volumen
Glicerol	0,3 % en peso/volumen
Scotasol	0,1 % en peso/volumen
Arkasoy	1 % en peso/volumen
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 % en peso/volumen

El medio se esteriliza calentando en autoclave a 15 psi (1,0 kg/cm<sup>2</sup>) durante 20 minutos y se inocula por adición de un 5 % de la fase de siembra vegetativa. Los matraces se sacuden a 26°C en un sacudidor rotatorio como en el Ejemplo 1. El título óptimo de ácido clavulánico se alcanza entre 3 y 5 días después. Una dilución de 1/2500 del filtrado de cultivo da una inhibición del 50 % en el ensayo de inhibición de la β-lactamasa. Se observa una zona de ácido clavulánico a R<sub>f</sub> 0,46 cuando se utiliza el método de cromatografía en papel (bioautografía) anteriormente descrito. El tamaño de esta zona aumenta paralelamente con el aumento de la actividad en el ensayo del inhibidor de β-lactamasa.

1 [Almidón soluble suministrado por British Drug  
Houses Ltd., Poole, Inglaterra;  
Scotasol es soluble de destilería desecados,  
suministrados por Thomas Borthwich Ltd., 60  
5 Wellington Street, Glasgow, Inglaterra;  
Arkasoy es harina de soja suministrada por  
British Arkady Co., Old Trafford, Manchester,  
Inglaterra].

EJEMPLO 3

10 Cultivo de Streptomyces clavuligerus

Se utiliza un matraz de siembra producido en el  
Ejemplo 1 para inocular matraces cónicos de 500 ml que  
contienen partes alícuotas de 100 ml del siguiente medio,  
preparado en agua desionizada y esterilizado como ya se  
15 ha descrito. El nivel de inoculum es el 5 %.

Dextrina	2 %	en peso/volumen
Arkasoy	1 %	en peso/volumen
Scotasol	0,1 %	en peso/volumen
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 %	en peso/volumen

20 Los matraces inoculados se sacuden a 26°C. Se al-  
canza la actividad óptima inhibitoria de β-lactamasa en-  
tre 3 y 5 días después. La actividad es similar a la con-  
seguida en el Ejemplo 2.

25 [La dextrina es suministrada por CPC (UK) Ltd.,  
Trafford Park, Manchester, Inglaterra].

1

EJEMPLO 4

Cultivo de Streptomyces clavuligerus

Se utiliza la fase de siembra descrita en el Ejemplo 1 para inocular matraces cónicos de 500 ml que contienen el siguiente medio, preparado en agua desionizada.

5

Dextrosa	1	% en peso/volumen
Harina de soja	1	% en peso/volumen
Scotasol	0,05	% en peso/volumen
CaCO <sub>3</sub>	1	% en peso/volumen

10

Estos matraces se tratan exactamente igual que en los ejemplos anteriores y se cultivan en condiciones idénticas. La actividad inhibitoria de  $\beta$ -lactamasa se produce entre 3 y 5 días después. El filtrado de cultivo a una dilución final de 1/2500 da una inhibición del 35-45 % en el ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa.

15

EJEMPLO 5

Cultivo de Streptomyces clavuligerus

Se produce una actividad inhibitoria de  $\beta$ -lactamasa atribuible al ácido clavulánico utilizando el siguiente medio, con una fase de siembra y unas condiciones de cultivo idénticas a las del Ejemplo 1.

20

Glicerol	2	% en peso/volumen
Harina de soja	1,5	% en peso/volumen
MgSO <sub>4</sub>	0,1	% en peso/volumen
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	% en peso/volumen

25

El medio se prepara en agua desionizada.

1 La actividad inhibitoria de la  $\beta$ -lactamasa alcan-  
za un nivel máximo entre 3 y 5 días después y es de un or-  
den similar a la producida en el Ejemplo 4.

#### EJEMPLO 6

##### Cultivo de Streptomyces clavuligerus

5 El siguiente medio produce ácido clavulánico cuan-  
do se utilizan las condiciones y el inoculum de siembra  
vegetativo descritos en el Ejemplo 1.

10	Glucosa	2	%
	Lab Lemco (Oxoid)	1	%
	Extracto de levadu- ra Oxoid	0,3	%
	CaCO <sub>3</sub>	0,3	%

El medio se prepara en agua destionizada.

15 Se alcanzan los títulos óptimos al cabo de 3-5  
días y una dilución 1/2500 del filtrado de cultivo da una  
inhibición del 35-45 % en el ensayo de inhibición del en-  
zima  $\beta$ -lactamasa.

#### EJEMPLO 7

##### Cultivo de Streptomyces clavuligerus

20 Como en los Ejemplos 4, 5 y 6, el siguiente me-  
dio produce una inhibición del 35-45 % (dilución 1/2500)  
en el ensayo de la  $\beta$ -lactamasa al título óptimo que se al-  
canza al cabo de 3-5 días de la inoculación. Todas las con-  
25 diciones son iguales a las anteriormente descritas.

1	Glucosa	2 %	en peso/volumen
	Arkasoy	1 %	en peso/volumen
	Ca CO <sub>3</sub>	0,02 %	en peso/volumen
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0001 %	en peso/volumen
5	El medio se prepara en agua desionizada.		

EJEMPLO 8

Cultivo de Streptomyces clavuligerus

10 Cuando se utiliza el siguiente medio de fase de producción bajo condiciones de cultivo normales, como las descritas en los Ejemplos anteriores, se produce una inhibición del 20-30 % a una dilución de 1/2500 en el ensayo de la β-lactamasa, entre 3 y 5 días después de la inoculación. Utilizando el método cromatográfico en papel anteriormente descrito, se observa una zona de ácido clavulánico a R<sub>f</sub> 0,46 cuando se examina el filtrado del cultivo.

15	Scotasol	2 %
	Extracto de levadura Oxoid	1 %
	El medio se prepara en agua corriente.	
	El pH final es 7,0.	

20 EJEMPLO 9

Cultivo de Streptomyces clavuligerus

25 Bajo condiciones de cultivo normales, el siguiente medio produce ácido clavulánico entre 3 y 5 días después de la inoculación con una siembra vegetativa. Una dilución 1/2500 del cultivo da una inhibición del 20-30 % en el en-

1 sayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa.

	<u>g/l</u>
	15
Glicerol	
	20
Sacarosa	
5	2,5
Prolina	
	1,5
Glutamato monosódico	
	5,0
NaCl	
	2,0
$K_2HPO_4$	
	0,4
$CaCl_2$	
10	0,1
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	
	0,1
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	
	0,05
$ZnCl_2$	
	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	

El medio se prepara en agua desionizada.

15 El pH final es 7,1.

#### EJEMPLO 10

##### Cultivo de *Streptomyces clavuligerus*

Se utiliza un tubo inclinado de agar Yeatex/gluco  
sa de reserva para inocular un tubo inclinado de agar  
20 Yeatex/glucosa en un frasco Roux, formando una suspensión  
de micelio/esporas en agua estéril. El frasco Roux incli-  
nado se incuba a 26°C durante 10 días. A este frasco incli-  
nado se añaden 100 ml de agua estéril y se prepara una sus-  
pensión micelial. Esta se utiliza para inocular 50 litros  
25 de un medio de siembra esterilizado al vapor, de la si-

1 guiente composición, en agua corriente.

Extracto de malta Oxoid 1 % en peso/volumen  
Peptona bacteriológica Oxoid 1 % en peso/volumen  
Glicerol 1 % en peso/volumen

5 Antiespumante Pluronic L81  
al 10 % en aceite de soja 0,05 % en peso/volumen

[El Pluronic es suministrado por Jacobs and Van den  
10 Berg UK Ltd., 231 The Vale, Londres, W3, contiene  
un polímero de bloque de polipropileno-poliétileno  
y el aceite de soja es suministrado por la  
British Oil and Cake Mills Ltd., Stoneferry Road,  
Hull, Inglaterra].

El medio está contenido en un fermentador tabicado  
de acero inoxidable, de 90 litros, agitado por un impulsor  
de disco de paletas de 5" (12,7 cm) a 240 rpm. Se suministra  
15 aire estéril a 50 l/minuto y el tanque se incuba a  
26°C.

Al cabo de 72 horas, el fermentador de siembra se  
utiliza para inocular 150 litros del mismo medio, utilizando  
20 una adición del 5 % en volumen/volumen por transferencia  
estéril. Este medio de fase de producción está contenido  
en un fermentador totalmente tabicado de acero inoxidable,  
de 300 litros, agitado por un impulsor de disco de paletas  
de 8,5" (22,3 cm) a 210 rpm. Se suministra aire estéril  
25 a 150 l/minuto. La fermentación se mantiene a 26°C. Se

1           añade antiespumante cuando es necesario en bloques de  
10 ml (Pluronic L81 al 10 % en aceite de soja). Se to-  
man muestras para el ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lacta-  
masa a intervalos regulares. El fermentador se cosecha en-  
5           tre 4 y 5 días después al nivel óptimo de actividad inhi-  
bitoria de  $\beta$ -lactamasa (Tabla II).

TABLA II

Actividad inhibitoria de la  $\beta$ -lactamasa de muestras del  
filtrado de cultivo tomadas de un fermentador de 300 li-  
10           tros de Streptomyces clavuligerus

<u>Tiempo de fer-</u> <u>mentación</u> <u>(días)</u>	<u>% de inhibición en el ensayo de in-</u> <u>hibición de la <math>\beta</math>-lactamasa a una di-</u> <u>lución final de 1/2500</u>
1,0	12
1,5	20
15       2,0	31
2,5	36
3,0	50
3,5	54
4,0	51
20       4,5	56
5,0	55

EJEMPLO 11

Cultivo de Streptomyces clavuligerus

25           El fermentador de siembra se opera exactamente co-  
mo se ha descrito en el Ejemplo 10, utilizando el mismo

1

medio.

5

10

Al cabo de 72 horas, el fermentador de siembra se utiliza para introducir un inoculum vegetativo al 5 % en volumen/volumen en un fermentador totalmente tabicado de acero inoxidable, de 300 litros, conteniendo 150 litros de un medio esterilizado al vapor, agitado por un impulsor de disco de paletas de 8,5" (22,3 cm) a 210 rpm. Se suministra aire estéril a 150 l/minuto. La fermentación se mantiene a 26°C. Se añade antiespumante cuando sea necesario en lotes de 10 ml (Pluronic L81 al 10 % en aceite de soja).

15

El medio utilizado en la fase de producción es el descrito en el Ejemplo 3 con adición de 0,05 % en volumen/volumen de antiespumante Pluronic L81 al 10 % en aceite de soja antes de la esterilización.

20

La actividad inhibitoria de la  $\beta$ -lactamasa de las muestras de fermentación es similar a la del Ejemplo 10 (véase la Tabla II). El examen por cromatografía de papel revela una zona de ácido clavulánico a  $R_f$  0,46 utilizando el método bioautográfico (sinergismo) anteriormente descrito. El tamaño de la zona de ácido clavulánico aumenta paralelamente con el aumento en el ensayo de la inhibición de la  $\beta$ -lactamasa.

25

#### EJEMPLO 12

##### Cultivo de *Streptomyces clavuligerus*

Se añaden 100 ml de agua estéril a un cultivo esporulante que ha sido cultivado sobre agar Bennetts en un

1 frasco Roux durante 10 días a 26°C. Se produce una sus-  
pensión de micelio/esporas que se utiliza para inocular  
75 litros de un medio esterilizado al vapor de la siguien-  
te composición en agua corriente:

5                   Dextrina                   2 %       en peso/volumen  
                  Arkasoy "50"               1 %       en peso/volumen  
                  Pluronic L81 al 10 %  
                  en aceite de soja       0,03 % en volumen/volumen

El pH del medio se ajusta a 7,0.

10 El medio se encuentra en un fermentador tabicado  
de acero inoxidable, de 100 litros, agitado con un impul-  
sor de disco de paletas de 7,5" (19,0 cm) a 140 rpm. Se  
suministra aire estéril a razón de 75 l/minuto y el tar-  
que se incuba durante 72 horas a 26°C.

15 El contenido del fermentador de siembra se utiliza  
para inocular 1500 litros de un medio esterilizado al va-  
por de la siguiente composición, en agua corriente: "

                  Arkasoy "50"               1,5 % en peso/volumen  
                  Glicerol                   1,0 % en peso/volumen  
20                   KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                   0,1 % en peso/volumen  
                  Pluronic L81 al 10 %  
                  en aceite de soja       0,2 % en volumen/volumen

El pH del medio se ajusta a 7,0.

25 El medio está contenido en un fermentador total-  
mente tabicado de acero inoxidable, de 2000 litros, agi-  
tado mediante dos impulsores de disco de paletas de 19"

1 (48,3 cm) a 106 rpm.

Se suministra aire estéril a 1200 litros por minuto. Se añade antiespumante en lotes de 25 ml a medida que es necesario (Pluronic L81 al 10 % en aceite de soja).  
5 La fermentación se controla a 26°C hasta que se obtiene un rendimiento máximo de ácido clavulánico entre 3 y 5 días después, cuando se producen 200-300 µg/ml de ácido clavulánico.

### EJEMPLO 13

#### 10 Cultivo de Streptomyces clavuligerus

Se produce un inoculum en un matraz de siembra como se ha descrito anteriormente pero empleando el medio descrito en el Ejemplo 3 (ajustando el pH del medio a 7,0). Este se utiliza para inocular matraces cónicos de  
15 500 ml que contienen partes alícuotas de 100 ml del siguiente medio, preparado en agua desionizada y esterilizado. La proporción de inoculum es del 5 %.

Prichem P224	1 % en peso/volumen
Arkasoy "50"	1,5 % en peso/volumen
20 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 % en peso/volumen

El pH del medio se ajusta a 7,0.

Los matraces inoculados se sacuden a 26°C y la actividad óptima de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa se alcanza entre 3 y 5 días después. Se llega a unos niveles de  
25 ácido clavulánico de 300-500 µg/ml.

1 El Prichem P224 es un triglicérido suministrado  
por Prices Limited, Bromborough, Bebington, Wirral, Cheshire  
Inglaterra. (El Prichem P224 está basado en ácido oléico -  
(65%), ácido palmitico (11%) y otros ácidos similares).

#### 5 EJEMPLO 14

#### Aislamiento de la sal sódica cruda del ácido clau- vulánico

10 El líquido de cultivo cosechado, producido en la  
forma descrita en el Ejemplo 10, se clarifica mediante  
centrifugación de flujo continuo y se desprecia el mico-  
lio. A partir de 150 litros del líquido de fermentación  
se obtienen 120 litros del líquido de cultivo clarifica-  
do. Este filtrado produce una inhibición del 58 % en el  
ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa a 1/2500. El fil-  
trado se enfría a 5°C y se añaden 40 litros de n-butanol.  
15 Se agita la mezcla y se añade  $H_2SO_4$  al 25 % hasta que el  
pH es 2,0. La mezcla acidulada se agita durante 10 minu-  
tos más antes de separar las fases por centrifugación. Se  
desprecia la fase acuosa. Al extracto n-butanólico se  
añade 0,5 % de carbón Norit GSX y la mezcla se agita du-  
20 rante 15 minutos. Se desprecia el carbón después de sepa-  
rarlo por filtración utilizando una tierra de diatomeas  
como auxiliar de filtración. Al n-butanol se añade 1/4 de  
su volumen de agua desionizada y la mezcla se agita mien-  
tras se añade una solución de NaOH al 20 % hasta que el  
25 pH se ha equilibrado en 7,0. Se separan las fases por cen-

1           trifugación y se desprecia la fase n-butanólica. La fa-  
se acuosa se concentra a presión reducida hasta 800 ml  
y después se liofiliza. Así se obtienen 35 g de un pre-  
parado sólido crudo de ácido clavulánico con un  $I_{50}$  de  
5           1,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa.  
Este preparado sólido se almacena en seco a  $-20^{\circ}\text{C}$  mien-  
tras espera para su purificación.

#### EJEMPLO 15

##### Aislamiento de la sal sódica cruda del ácido clavulánico

10           Un litro del filtrado de cultivo que da una inhi-  
bición del 53 % a 1/2500 en el ensayo de inhibición de la  
 $\beta$ -lactamasa y obtenido en la forma descrita en el Ejem-  
plo 2 es percolado a través de una columna de 1" (2,5 cm)  
de diámetro x 6" (15 cm) de resina Permutit Isopore FF 1P  
15           (SRA 62) en la forma  $\text{Cl}^-$  (suministrada por Permutit Co.  
Ltd., 632-652 London Road, Isleworth, Middlesex, Inglate-  
rra). El filtrado del cultivo va seguido de 300 ml de agua  
destilada para lavar la columna. La elución del inhibidor  
activo de  $\beta$ -lactamasa se consigue con solución 0,2 M de  
20           NaCl. Se recogen fracciones de 20 ml y se analizan a una  
dilución final de 1/2500 en el ensayo de inhibición de la  
 $\beta$ -lactamasa. Se combinan las fracciones activas y se con-  
centran a vacío hasta 20 ml. Esta solución se desalifica  
por cromatografía con exclusión de gel sobre una columna  
25           Biorad Biogel P2 de 1,5" (3,8 cm) de diámetro, con un le-

1 cho de gel de 16" (40,6 cm) y se eluye con n-butanol al  
1 % en agua. (El Biogel P2 es suministrado por Bio Rad La-  
boratories, 32nd and Griffin Ave., Richmond, California,  
Estados Unidos). Se combinan las fracciones activas, de-  
5 terminadas por el ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa.  
El cloruro sódico eluye después del ácido clavulánico y  
es detectado utilizando una solución de nitrato de plata.  
Las fracciones activas combinadas se concentran y liofili-  
zan. Después del tratamiento anterior, 1 litro del filtra-  
do del cultivo da 0,45 g de un preparado sólido crudo de  
10 ácido clavulánico con un  $I_{50}$  de 0,92  $\mu\text{g/ml}$ .

Este sólido se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  mientras se espe-  
ra para su purificación.

#### EJEMPLO 16

##### 15 Aislamiento de sal sódica cruda de ácido clavulánico

El filtrado de cultivo que contiene 300  $\mu\text{g/ml}$  de  
ácido clavulánico se acidula utilizando un sistema mezclador  
incorporado, se extrae con n-butanol y el ácido cla-  
vulánico es retroextraído en agua a pH neutro.

20 El filtrado de cultivo enfriado ( $5-10^{\circ}\text{C}$ ) se bom-  
bea a un mezclador incorporado a cuya entrada se añade su-  
ficiente ácido nítrico al 6 % (volumen/volumen) para man-  
tener un pH de salida de  $2,0 \pm 0,1$ . El filtrado acidulado  
se pasa a razón de 4 l/minuto a través de un cambiador de  
25 calor de placa enfriada con glicol (A.P.V. Ltd.) para man-

1 tener una temperatura entre 2 y 5°. El pH se determina en una célula de flujo antes de pasar a un separador en contracorriente de tres pisos (Westfalia Separator Ltd., Modelo EG 1006).

5 Se bombea n-butanol saturado con agua y enfriado (a unos 5°C) a razón de 3 litros/minuto en el separador en contracorriente.

10 La mezcla acuosa que sale del separador en contracorriente se tira por el sumidero. El agua arrastrada se separa del caudal de butanol del separador de contracorriente utilizando un separador centrífugo de líquido/líquido. (Alfa Laval Ltd. Modelo 3024X-G). El butanol se recoge en una vasija de acero inoxidable provista de una camisa de refrigeración en la que se almacena a unos 15 5°C.

20 De la vasija se sacan partes alícuotas de 40 litros y se mezclan íntimamente con 2 litros de agua enfriada (5°C), saturada con n-butanol. El pH de esta mezcla se ajusta a  $6,8 \pm 0,1$  utilizando una solución de hidróxido sódico al 20 %.

Esta mezcla de extracto acuoso/butanol se introduce en un separador centrífugo de líquido/líquido (Sharples Centrifuge Ltd. Modelo M35PY-5 PH) a una velocidad de bombeo de 2 litros/minuto.

25 A partir de 1800 litros de filtrado de cultivo

1 se recuperan 90 litros de fase acuosa que contienen 39 % del ácido clavulánico presente en el filtrado de cultivo.

5 Se ajustan 15 litros del extracto acuoso desde 2 % hasta 8 % de sólidos totales mediante la adición de 60 g de cloruro sódico por litro y se secan por atomización (Anhydro, Copenhagen, Type Lab S 1). Las condiciones utilizadas son: caudal de alimentación, 2 litros/hora; voltaje del atomizador, 170 V; posición del calentador, 6-7; temperatura de entrada, 150°C; temperatura de salida, 80°C.

10 El producto seco, con un peso total de 1 kg, contiene 62 % del ácido clavulánico presente en el material de alimentación.

15 Los 75 litros restantes de extracto acuoso se concentran por ultrafiltración (De Danske Sukkerfabrikker, Laboratory Module, Membrane Type 900). La operación consiste en recircular el retentado desde un tanque de acero inoxidable, provisto de un sistema refrigerante, con la válvula de salida situada de manera que produce una presión diferencial a través de las 40 membranas de 25 atmósferas.

20 La temperatura se mantiene a 2-5°C y el pH a 6,8 ± 0,1 por adición de ácido clorhídrico 2 N cuando sea necesario. El volumen se reduce a 34 litros que contienen el 72 % del ácido clavulánico presente en el material de alimentación.

25 El concentrado acuoso se almacena a unos 5°C, se

1 ajusta al 8 % de sólidos y se seca por atomización como  
antes. El material seco contiene 75 % del ácido clavulá-  
nico presente en el material de alimentación al secadero  
por atomización.

5 El producto total secado por atomización, proce-  
dente de los 90 litros de extracto acuoso, contiene  
69,4 g de ácido clavulánico que constituye el 72 % del  
ácido clavulánico presente en el material de alimenta-  
ción al secado por atomización y el 21 % del ácido clavu-  
lánico presente en los 1800 litros del filtrado de culti-  
10 vo.

#### EJEMPLO 17

##### Purificación parcial del ácido clavulánico crudo

15 Los preparados de ácido clavulánico crudo obteni-  
dos en la forma descrita en el Ejemplo 15 se purifican por  
cromatografía de intercambio de ión. En 25 ml de agua des-  
tilada se disuelven 18 g del material preparado en la for-  
ma descrita en el Ejemplo 15, con un valor  $I_{50}$  de 1,3  $\mu\text{g/ml}$   
(concentración final) y se aplica a un lecho de 1,5" x 16"  
20 (3,8 x 40,6 cm) de resina Permutit FF 1P (SRA 62) en la  
forma de cloruro. La columna se eluye con un gradiente de  
cloruro sódico formado por alimentación por la acción de  
la gravedad de cloruro sódico 0,5 M en un depósito mezcla-  
dor que contiene 1 litro de agua destilada que a su vez  
25 alimenta a la columna cromatográfica. Se recogen fraccio-

1 nes de 10 ml y la actividad inhibitoria de la  $\beta$ -lactama-  
sa se determina utilizando una diluci3n 1/2500 de las  
fracciones. La actividad se eluye despu3s de una banda  
principal de color entre las fracciones 24 y 30. Las frac-  
5 ciones activas se combinan y concentran hasta 30 ml.

Esta soluci3n se desalifica utilizando un lecho  
de 2" x 18" (5,1 x 45,7 cm) de Biorad Biogel P2 y eluyen-  
do con n-butanol al 1 % en agua. Las fracciones de 20 ml  
se analizan para determinar el contenido de 3cido clavul3-  
10 nico utilizando el ensayo de inhibici3n de la  $\beta$ -lactamasa.  
Las fracciones tambi3n se depositan sobre tiras de papel  
y se roc3an con los reactivos Ehrlich o de trifeniltetra-  
zolio descritos en la Descripci3n 3. La actividad inhibi-  
toria de la  $\beta$ -lactamasa est3 relacionada con las manchas  
15 rosas o rojas respectivamente producidas por estos reacti-  
vos. Se combinan las fracciones activas, excluyendo las  
que contienen cloruro s3dico y se concentran a sequedad a  
vac3o. As3 se obtienen 520 mg de sal s3dica del 3cido  
clavul3nico parcialmente purificada, con un  $I_{50}$  de  
20 0,2  $\mu\text{g/ml}$  en el ensayo normal de inhibici3n de la  $\beta$ -lacta-  
masa.

Por cromatograf3a en capa fina (gel de s3lice)  
de este preparado de 3cido clavul3nico se obtienen los si-  
guientes valores  $R_f$ : n-butanol/etanol/agua 4:1:5 volumen/  
25 volumen, fase superior,  $R_f$  0,37; n-butanol/3cido ac3ti-

1 co/agua 12:3:5 en volumen/volumen,  $R_f$  0,44; isopropal-  
nol/agua 7:3 en volumen/volumen,  $R_f$  0,78. Las zonas se  
detectan rociando con reactivo de Ehrlich. El ácido  
6-aminopenicilánico desarrollado como marcador y detec-  
5 tado con los mismos reactivos presenta unos valores  $R_f$   
de 0,38, 0,39 y 0,77, respectivamente.

#### EJEMPLO 18

#### Purificación parcial de la sal sódica del ácido clavu- lánico

10 El filtrado de cultivo producido en la forma des-  
crita en el Ejemplo 12 se extrae con disolvente como en  
el Ejemplo 14 para formar un preparado sólido que se pu-  
rifica por cromatografía de intercambio de ión utilizan-  
do dietilaminoetilcelulosa Whatman DE 52. Este sólido  
15 (10 g) se disuelve en 20 ml de agua destilada y se apli-  
ca a una columna de 1,5" x 20" (3,8 x 50,8 cm) de celulo-  
sa DE 52, previamente equilibrada con solución reguladora  
de fosfato sódico 0,01 M a pH 7,5. La columna se eluye  
con gradiente de NaCl. Se introducen NaCl 0,1 M en solu-  
20 ción reguladora de fosfato sódico 0,01 M a pH 7,5 en una  
cámara mezcladora que contiene 1 litro de solución regu-  
ladora de fosfato 0,01 M a pH 7,5, que a su vez está co-  
nectada con la columna. Se recogen fracciones de 10 ml y  
25 en éstas se analiza la actividad inhibitoria de la  $\beta$ -lac-  
tamasa a una dilución de 1/2500. También se examina en

1 las fracciones la actividad antibacteriana por el método  
de ensayo de pozo en placa, utilizando placas de agar nu-  
trientes sembradas con Klebsiella aerogenes. Las fraccio-  
nes con la máxima actividad inhibitoria de  $\beta$ -lactamasa y  
5 que dan zonas de inhibición en el ensayo de pozo en placa  
se combinan, se concentran y después se desalifican en  
una columna Biorad Biogel P2. Se demuestra que estas  
fracciones contienen ácido clavulánico por cromatografía  
en papel y en capa fina.

#### 10 EJEMPLO 19

#### Aislamiento de la sal sódica del ácido clavulánico sólida

Un preparado sólido parcialmente purificado de  
ácido clavulánico (500 mg), obtenido como en el Ejem-  
15 plo 17, se carga en una columna de celulosa microcrista-  
lina Whatman CC 31 con un tamaño del lecho de 1" x 20"  
(2,5 x 50,8 cm). El disolvente cromatográfico es la fase  
superior de n-butanol/etanol/agua 4:1:5 en volumen/vo-  
lumen. La columna se desarrolla a 4°C y se recogen frac-  
20 ciones de 4 ml. En las fracciones se determina la pre-  
sencia de ácido clavulánico colocando manchas sobre  
papel de filtro y rociando con los reactivos Ehrlich  
(mancha rosa) o de trifeniltetrazolio (mancha roja). Es-  
tos ensayos de manchas son confirmados por ensayos de  
25 inhibición de la  $\beta$ -lactamasa a una dilución de 1/1250.

1 Las fracciones activas se combinan y se secan a vacío  
en un evaporador rotatorio. El sólido se disuelve en  
un pequeño volumen de agua destilada y se liofiliza.  
Se obtiene un preparado sólido blanco (40 mg) de la  
5 sal sódica del ácido clavulánico con un  $I_{50}$  de 0,08  
 $\mu\text{g/ml}$  en el ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa.

#### EJEMPLO 20

#### Aislamiento de la sal sódica del ácido clavulánico sólida

10 El retroextracto concentrado (6 litros) (procedente de la ultrafiltración en el Ejemplo 16), conteniendo 10 g de ácido clavulánico, determinado por el ensayo de inhibición de la  $\beta$ -lactamasa de la Descripción 1, es percolado a razón de 1 litro/hora sobre una  
15 columna de 2" x 24" (5,1 x 61,0 cm) de la resina cambiadora de anión Permutit Zerolit FF 1 P SRA 62 en forma de cloruro. Después la columna se lava con 2 litros de agua desionizada antes de eluir con un gradiente de cloruro sódico. El gradiente se forma mediante un depósito que contiene 4 litros de NaCl 1,4 M que alimenta a  
20 un depósito agitado que contiene 4 litros de NaCl 0,7 M que a su vez está conectado con un depósito agitado que contiene 4 litros de agua desionizada, que está conectado a través de una bomba con la columna. La columna se  
25 eluye a 2,5 ml/minuto y se recogen fracciones de 25 ml.

1 Las fracciones se analizan por el ensayo de inhibición  
de la  $\beta$ -lactamasa. Se combinan las fracciones activas  
(números 140 a 230) y se evaporan a vacío hasta casi se-  
5 quedad. Después se añaden 500 ml de etanol y el sólido  
se separa por filtración después de sacudir fuertemente.  
El extracto etanólico se evapora después a vacío hasta  
sequedad sobre un evaporador rotatorio y se redisuelve  
10 en 40 ml de agua desionizada. Esta solución se carga en  
una columna de 4" x 24" (10,2 x 61,0 cm) de Biorad Biogel  
P<sub>2</sub> y se eluye con una solución de n-butanol al 1 %. Se  
recogen las fracciones de 25 ml y se determina la acti-  
15 vidad inhibitoria de la  $\beta$ -lactamasa a una dilución fi-  
nal de 1/2500. Las determinaciones del contenido de clo-  
ruro sódico sobre diluciones de 1/25 de las fracciones  
se realizan utilizando solución de nitrato de plata. Las  
20 fracciones que contienen ácido clavulánico exento de clo-  
ruro sódico se combinan, se concentran por evaporación  
del disolvente a presión reducida hasta 20 ml y después  
se liofilizan. Así se obtienen 4,8 g de la sal sódica  
25 del ácido clavulánico (I<sub>50</sub> alrededor de 0,06  $\mu$ g/ml).

1

EJEMPLO 21

Preparación del éster bencílico del ácido clavulánico a partir de extractos crudos del filtrado de cultivo de S. clavuligerus

5

Se evaporan a vacío 20 litros del filtrado de cultivo obtenido en la forma descrita en el Ejemplo 10, utilizando un evaporador de película ascendente, hasta 5 litros. Después el concentrado se liofiliza utilizando un autoliofilizador Edwards E.F.6, manufacturado por Edwards High Vacuum Ltd. Los 300 g del sólido así obtenidos contienen 3 g de clavulanato sódico, determinado por el ensayo de inhibición de enzimas. El sólido se suspende en 900 ml de dimetilformamida seca y se añaden 150 ml de bromuro de bencilo. La mezcla se agita durante 2 horas a la temperatura ambiente y después se diluye con 1 litro de acetato de etilo. Se filtra la mezcla de reacción y el filtrado se concentra hasta el volumen más bajo posible. El residuo oleoso se extrae con otro litro de acetato de etilo y se filtra el extracto. El filtrado se concentra de nuevo y el residuo oleoso resultante se carga en una columna de gel de sílice de 3" x 14" (7,6 x 35,6 cm) (Biogel Biosil A 100 mallas) en ciclohexano. La columna se eluye con ciclohexano para separar el bromuro de bencilo y después se cambia el disolvente por acetato de

10

15

20

25

1 etilo y se recogen fracciones de 20 ml. En las fraccio-  
nes se determina la presencia del éster bencílico del  
ácido clavulánico formando manchas sobre placas de cro-  
matografía en capa fina de gel de sílice con soporte de  
5 vidrio (gel de sílice precubierto de Merck 60 F 254) y  
rociándolas con el reactivo cloruro de 2,3,5-trifenil-  
tetrazolio (TTC). Las fracciones que forman manchas de  
color rojo intenso con este reactivo se examinan de nue-  
vo por cromatografía en capa fina sobre placas de gel de  
10 sílice, utilizando cloroformo/acetato de etilo 8:2 como  
disolvente y rociando las placas desarrolladas con TTC.  
El éster bencílico del ácido clavulánico pasa a  $R_f$  0,31  
a 22°C. Se combinan las fracciones que contienen este  
éster y se concentran hasta 15 ml y esta solución se  
15 cromatografía de nuevo en una columna de gel de sílice  
de 1,5" x 16" (3,8 x 40,6 cm) (gel de sílice Merck H,  
tipo 60) con cloroformo/acetato de etilo 8:2 como disol-  
vente. Se recogen fracciones de 15 ml y se determina el  
éster bencílico como se ha descrito antes. Las fraccio-  
20 nes que contienen el éster se concentran hasta 8 ml y  
finalmente se purifican por cromatografía en columna so-  
bre una columna de gel de sílice de 1" x 16" (2,5 x 40,6  
cm) (gel de sílice Merck H, tipo 60) con acetato de eti-  
lo/ciclohexano 8:2 como disolvente. Las fracciones selec-  
25 cionadas se combinan y se evaporan a vacío para dar el

1 éster bencílico puro en forma de aceite (160 mg).

### EJEMPLO 22

#### Preparación del éster bencílico del ácido clavulánico

5 Se obtienen 3,3 kg de un sólido secado por atomi-  
zación que contiene 69,4 g de ácido clavulánico, determi-  
nado por el ensayo de inhibición del enzima, como se des-  
cribe en el Ejemplo 16. El sólido se suspende en 5,5 li-  
tros de dimetilformamida y se añaden 500 ml de bromuro de  
10 bencilo. Después de agitar a la temperatura ambiente du-  
rante 2 horas, se añaden 12 l de acetato de etilo y el só-  
lido se separa por filtración. El filtrado se evapora a  
vacío hasta formar 212 g de un residuo oleoso. El residuo  
se carga en una columna que contiene un lecho de gel de  
15 sílice (Hopkins & Williams MFG) de 4" x 13" (10,2 x 33,0  
cm) en ciclohexano. La columna se eluye con 12 litros de  
ciclohexano para separar el exceso de bromuro de bencilo.  
Después se cambia el eluyente por acetato de etilo y se  
recogen fracciones de 500 ml. En esta se determina el  
20 contenido en clavulanato de bencilo formando manchas so-  
bre placas de gel de sílice para cromatografía en capa fi-  
na (gel de sílice precubierta de Merck, 60 F 254) y rocián-  
do con el reactivo cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio  
(TTC). Las fracciones que dan manchas de color rojo inten-  
25 so se examinan de nuevo por cromatografía en capa fina so-  
bre gel de sílice con cloroformo/acetato de etilo 8:2 co-

1 mo disolvente y rociando las placas desarrolladas con  
reactivo TTC. Las fracciones 5-13 contienen la mayor parte  
del éster y éstas se combinan y se concentran a vacío has-  
ta dar 79,3 g de un aceite. Este preparado se cromatogra-  
5 fía después sobre una columna de gel de sílice (gel de sí-  
lice Merck H tipo 60) de 4" x 18" (10,2 x 45,7 cm), con clo-  
roformo/acetato de etilo 8:2 como disolvente. Se seleccio-  
nan las fracciones como se ha descrito antes y, por concen-  
tración, dan 45,9 g de aceite con una pureza del 62%, deter-  
10 minada por espectroscopía RMN.

Este producto se cromatografía finalmente sobre una  
columna de 2 3/4" x 18" (7,0 x 45,7 cm) de Sephadex LH 20  
en ciclohexano/cloroformo 1:1. Después de seleccionar las  
fracciones y concentrar, se obtienen 27,6 g de un aceite in-  
15 coloro que resulta ser éster bencílico del ácido clavulánico  
con una pureza del 95% determinada por examen espectroscópi-  
co RMN. (Sephadex LH20 es un derivado de hidroxipropilo de  
Sephadex Q25 suministrado por Pharmacia Great Britain, 75  
Uxbridge Road, London, W5, U.K.

### 20 EJEMPLO 23

#### Preparación del éster bencílico del ácido clavulánico

150 litros de un filtrado de cultivo a pH 7,0 contie-  
nen 16,2 g de ácido clavulánico (sal sódica), determinado por  
el ensayo de inhibición de enzimas. Este filtrado se agita con  
25 5 kg de una resina cambiadora de anión Amberlyst A.26 en forma

1 de cloruro (Rohm & Haas Company, Philadelphia, USA)  
durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después la  
resina se filtra y el filtrado se vuelve a analizar,  
indicando que se han separado 6,4 g de ácido clavulánico.  
La resina se lava con 20 litros de agua desionizada,  
5 seguido de 20 litros de acetona y 10 litros de dimetil-  
formamida (DMF). Después de volver a filtrar, la re-  
sina se suspende en 2,3 litros de DMF/NaI 0,2 M. A  
esta mezcla se añaden 20 ml de bromuro de bencilo y la  
suspensión se agita bien. Después de permanecer en repo-  
10 so a la temperatura ambiente durante 2 horas, se añaden  
2 litros de acetato de etilo y después se filtra la re-  
sina, combinando con el filtrado las posteriores aguas  
de lavado (acetato de etilo) de la resina. Después el ex-  
tracto se concentra hasta pequeño volumen y se cromatogra-  
15 fía sobre una columna de gel de sílice de 3" x 18"  
(7,6 x 45,7 cm) (gel de sílice Merck H tipo 60) con ace-  
tato de etilo/ciclohexano 8:2 como disolvente. Se selec-  
cionan las fracciones que contienen clavulanato de benci-  
20 lo depositando manchas sobre placas de gel de sílice para  
cromatografía en capa fina y rociando con el reactivo TTC  
como se ha descrito anteriormente, (Ejemplo 24). Las  
fracciones seleccionadas se concentran hasta 20 ml y des-  
pués se cromatografían sobre una columna de gel de sílice  
25 de 1,5" x 18" (3,8 x 45,7 cm) (gel de sílice Merck H ti-  
po 60) con cloroformo/acetato de etilo 8:2 como disolven-

1 te. Las fracciones seleccionadas se combinan y evaporan hasta formar un aceite incoloro (440 mg) que es clavulanato de bencilo al 90 % de pureza, determinada por espectroscopía RMN.

#### EJEMPLO 24

5 Preparación del éster bencílico del ácido clavulánico a partir de extractos crudos del filtrado de cultivo de *S. clavuligerus*

10 Una parte alícuota del retroextracto acuoso del extracto butanólico del filtrado de cultivo obtenido en la forma descrita en el Ejemplo 14 se liofiliza utilizando un secadero de cámara Edwards. Una porción de 24 g del sólido obtenido contiene 0,96 de clavulanato sódico, determinado por el ensayo de inhibición del enzima. Este sólido se suspende en 75 ml de dimetilformamida seca y se añaden 75 ml de bromuro de bencilo. La mezcla se agita durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después la suspensión se diluye con 500 ml de acetato de etilo y se filtra la mezcla. El filtrado se concentra hasta formar un residuo oleoso en un evaporador rotatorio a vacío. Este residuo se carga en una columna de gel de sílice de 2" x 14" (5,1 x 35,6 cm) (Biogel Biosil A.100 mallas) en ciclohexano. Se eluye el bromuro de bencilo de la columna y después el disolvente se cambia por acetato de etilo y se recogen fracciones de 10 ml. Las fracciones que contienen el éster bencílico del ácido clavulánico se seleccionan

15

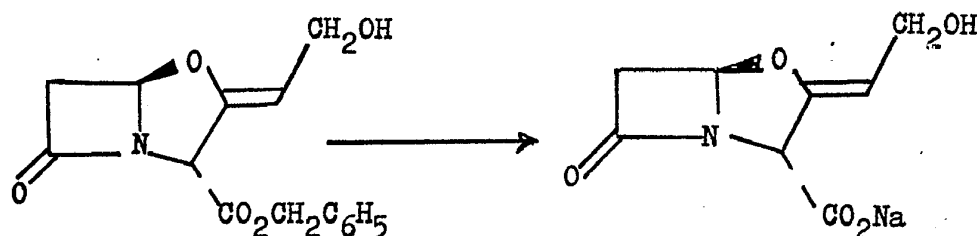
20

25

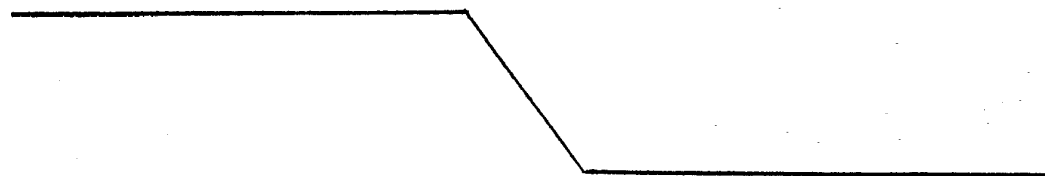
1 como en el Ejemplo 24. También se puede purificar todavía  
más como se ha descrito en el Ejemplo 24 por cromatografía  
en columna. Mediante este procedimiento se obtienen 220 mg  
del éster bencílico puro.

5 EJEMPLO 25

Preparación de la sal sódica del ácido clavulánico



15 Se hidrogenan 281 mg de clavulanato de bencilo  
prácticamente puro en 25 ml de etanol conteniendo 82 mg  
de carbonato sódico hidrógeno sobre 90 mg de paladio al  
10 % en carbón, durante 25 minutos, a la temperatura am-  
biente y a la presión atmosférica. Se separa el cataliza-  
dor por filtración, se lava con agua y etanol y los fil-  
trados combinados se evaporan a presión reducida y a la  
20 temperatura ambiente. El semisólido residual se tritura  
con acetona, se filtra y se lava con éter para dar 135 mg  
de clavulanato sódico.



1 EJEMPLO 26

Hidrólisis del éster metílico del ácido clavulánico a  
ácido clavulánico

5 Se disuelven 2,17 mg del éster del ácido clavulánico en 0,1 ml de metanol y se tratan con 0,208 ml de una solución de hidróxido sódico 0,0482 N. Al cabo de 1 hora a la temperatura ambiente, la mezcla de reacción contiene varios productos. El análisis por cromatografía en capa fina indica que uno de los principales componentes tiene un  $R_f$  idéntico al de la sal sódica del ácido clavulánico; las reacciones coloreadas y el ensayo biológico concuerdan con que este componente sea la sal sódica del ácido clavulánico.

15 La lenta conversión del éster en ácido clavulánico se observa cuando se incuba 1 mg/ml del compuesto a 37°C en solución reguladora de fosfato 0,05 M a pH 7. La reacción se sigue por cromatografía de papel (sistema bioautográfico). Utilizando el sistema butanol/etanol/agua para seguir la reacción durante un periodo de 2 horas, la zona del éster metílico a  $R_f$  0,79 disminuye de tamaño a medida que aumenta la zona de ácido clavulánico a  $R_f$  0,12.

EJEMPLO 27

Espectro antibacteriano del ácido clavulánico

25 La actividad antibacteriana de la sal del ácido clavulánico contra diversas bacterias fue determinada uti-

1 lizando el método del microtítulo. Unas diluciones seria-  
 das de la sal sódica del ácido clavulánico en caldo de en  
 sayo de la sensibilidad Oxoid, contenidas en una bandeja  
 de plástico para microtítulo, se inocularon con un culti  
 5 vo de caldo de una noche de cada uno de los organismos,  
 de manera que la dilución final del inoculum fuera de  
 0,5 x 10<sup>-4</sup>. Los cultivos se incubaron durante la noche y  
 los puntos de crecimiento bacteriano se registraron a la  
 mañana siguiente observando la turbidez del cultivo. Los  
 10 resultados, expresados como valores CMI aproximados (con-  
 centración mínima de inhibición, µg/ml) están registra-  
 dos en la Tabla III que muestra que el compuesto presenta  
 un amplio espectro de actividad antibacteriana.

TABLA III

15 Espectro antibacteriano de la sal sódica del ácido clavu-  
lánico

<u>Cepa bacteriana</u>	<u>Concentración mínima de inhibición, µg/ml</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> (Oxford H)	7,5
20 <u>Staphylococcus aureus</u> (Russell)	7,5
<u>Bacillus subtilis</u>	62
<u>Streptococcus faecalis</u>	> 500
<u>Streptococcus pyogenes</u> CN 10	125
<u>Escherichia coli</u> NCTC 10418	31
25 <u>Klebsiella aerogenes</u>	31 - 62

1

TABLA III (continuación)

	<u>Cepa bacteriana</u>	<u>Concentración mínima de inhibición, µg/ml</u>
	<u>Klebsiella oxytocolum</u>	62
5	<u>Enterobacter aerogenes</u> T 624	31
	<u>Enterobacter cloacae</u>	62
	<u>Acinetobacter anitratus</u>	125
	<u>Providentia stuartii</u>	125
	<u>Serratia marcescens</u>	125
10	<u>Proteus mirabilis</u> C977	62
	<u>Proteus vulgaris</u> W090	31
	<u>Salmonella typhimurium</u>	31
	<u>Shigella sonnei</u>	62
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> A	500

15

EJEMPLO 28.Ejemplos de la inhibición de la  $\beta$ -lactamasa por la sal sódica del ácido clavulánico

20

El ácido clavulánico inhibe progresiva e irreversiblemente la  $\beta$ -lactamasa del Escherichia coli. El método de la Descripción 1 indica que las otras  $\beta$ -lactamasas mostradas en la Tabla IV también son inhibidas por el ácido clavulánico.

25

TABLA IV

1

Inhibición de las  $\beta$ -lactamasas del ácido clavulánico

<u>Fuente de <math>\beta</math>-lactamasa</u>	<u>Valor <math>I_{50}</math> aproximado relativo al <math>\frac{Escherichia\ coli}{JT\ 4 = 1}</math></u>
<u>Staphylococcus aureus</u> (Russell)	1,0
5 <u>Escherichia coli</u> JT4	1,0
<u>Escherichia coli</u> B11	2,0
<u>Klebsiella aerogenes</u> A	0,6
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 1822 (factor R)	5,0
<u>Pseudomonas dalgleish</u>	0,1

10

Con penicilina G como substrato, el  $I_{50}$  de la sal sódica del ácido clavulánico contra la  $\beta$ -lactamasa de Staph. aureus (Russell) es aproximadamente 0,06  $\mu\text{g/ml}$ .

EJEMPLO 29

Preparación de ácido clavulánico

15

Se hidrogenan 100 mg de clavulanato de bencilo en 5 ml de etanol sobre 30 mg de paladio al 10 % en carbón, durante 45 minutos, a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica. Se filtra el catalizador, se lava con etanol y los filtrados combinados se evaporan a vacío para dar ácido clavulánico en forma de un aceite viscoso inestable (58 mg).

20

RMN ( $C_5D_5N$ ): 3,05 (d, 1,  $J = 18$  Hz), 3,60 (dd, 1,  $J_1 = 18$  Hz,  $J_2 = 2,5$  Hz), 4,75 (d, 2,  $J = 7,5$  Hz), 5,58 (t, 1,  $J = 7,5$  Hz), 5,66 (s, 1), 6,0 (d, 1,  $J =$

25

18 Hz) delta.

1 EJEMPLO 30

Preparación de clavulanato sódico

5 Se hidrogenan 840 mg de clavulanato de bencilo en 30 ml de etanol y 5 ml de agua sobre 267 mg de paladio al 10 % en carbón y 244 mg de bicarbonato sódico, durante 25 minutos, a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica. Se filtra el catalizador, se lava con agua y etanol y los filtrados combinados se evaporan a vacío. El producto cristaliza en una mezcla de 10 agua y acetona en forma de microagujas (565 mg). Por recristalización en agua-acetona se obtienen agujas que, después de secas sobre  $P_2O_5$  a vacío durante 24 horas, dan el siguiente análisis: C, 41,01, 40,86; H, 3,77, 3,64; N, 5,68, 5,51.

15 IR (disco de KBr): 1785, 1700, 1620  $cm^{-1}$ .

RMN ( $D_2O$ ): 3,06 (d, 1,  $J = 18,5$  Hz), 3,57 (dd, 1,  $J_1 = 18,5$  Hz,  $J_2 = 2,5$  Hz), 4,15 (d, 2,  $J = 8$  Hz), 5,3 (HOD), 4,9 (m), 5,71 (d, 1,  $J = 2,5$  Hz).

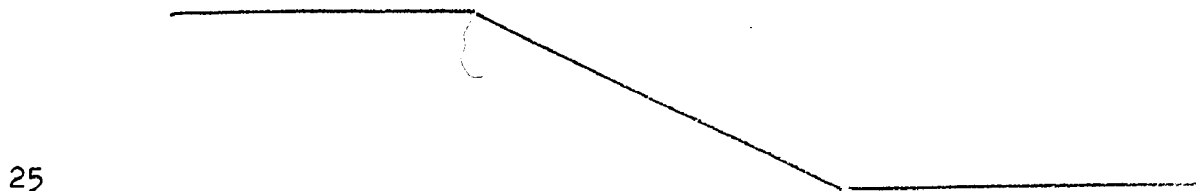
EJEMPLO 31:

20 Sinergismo antibacteriano entre ampicilina y sal sódica de ácido clavulánico

25 Se ha determinado la concentración mínima de inhibición (C.M.I.) de la ampicilina, sal sódica de ácido clavulánico y ampicilina en presencia de 1  $\mu g/ml$  de sal sódica de ácido clavulánico, para una serie de bac-

1 terias productoras de  $\beta$ -lactamasa. Los organismos son inoculados en un caldo de ensayo de la sensibilidad Oxoid situado en pequeños pozos en una bandeja de plástico y conteniendo gradientes de concentración separados de ampicilina, sal sódica de ácido clavulánico o ampicilina mas  
5 1  $\mu\text{g/ml}$  de sal sódica de ácido clavulánico (método del microtítulo). La dilución final durante la noche del caldo del inoculum es de  $0,5 \times 10^{-2}$ . La bandeja se incubaba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante la noche y a la siguiente mañana se registran los  
10 puntos finales de crecimiento bacteriano. Los valores C.M.I. en  $\mu\text{g/ml}$  están registrados en la tabla V, que revela que el sinergista a la baja concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  aumenta marcadamente la actividad antibacteriana de la ampicilina contra ciertas bacterias gram + ve y gram - ve. El mecanismo de estos sinergismos probablemente implica la inhibición de las enzimas  $\beta$ -lactamasa destructores de la ampicilina pero no puede excluirse la existencia de otros mecanismos.

15  
20 Se obtienen resultados similares a los indicados en la tabla V cuando la ampicilina se sustituye por amoxicilina o por el ester ftalidílico de ampicilina.



1

TABLA V

Sinergismo antibacteriano entre ampicilina y sal sódica  
de ácido clavulánico

Concentraciones mínimas de inhibición,  
µg/ml

<u>Cepa bacteriana</u>	<u>sal sódica</u> <u>de ácido</u> <u>clavulánico</u>	<u>Ampi-</u> <u>cilina</u>	<u>Ampicilina en</u> <u>presencia de</u> <u>1 µg/ml de sal</u> <u>sódica de áci</u> <u>do clavuláni-</u> <u>co</u>
<u>Escherichia coli</u> <u>NCTC 10481</u>	31	1,8	< 0,4
<u>Escherichia coli</u> <u>B 11</u>	62	> 500	125
<u>Klebsiella</u> <u>aerogenes A</u>	31	125	< 0,4
<u>Klebsiella sp. 62</u>	31	125	< 0,4
<u>Enterobacter</u> <u>clacae</u>	62	250	62
<u>Serratia marcescens</u>	125	> 500	62
<u>Staphylococcus</u> <u>aureus (Russell)</u>	15	500	< 0,4
<u>Staphylococcus</u> <u>aureus (una cepa resis</u> <u>tente a la meticilina)</u>	62	250	7,5

20

## EJEMPLO 32

Sinergismo antibacteriano entre cefaloridina y sal sódica  
de ácido clavulánico

25

Por el método descrito en el Ejemplo 42 se deter-  
minan las concentraciones mínimas de inhibición de la ce-  
faloridina, sal sódica del ácido clavulánico y cefaloridi

1 na en presencia de 5 µg/ml de sal sódica de ácido clavulánico. Los resultados de la Tabla VI indican que puede obtenerse un sinergismo entre la sal sódica del ácido clavulánico y la cefaloridina, especialmente para la cepa productora de β-lactamasa de Staphylococcus aureus (Russell).

TABLA VI

Sinergismo antibacteriano entre cefaloridina y sal sódica del ácido clavulánico

10 Concentraciones mínimas de inhibición, µg/ml

<u>Cepa bacteriana</u>	<u>Sal sódica de ácido clavulánico</u>	<u>Cefaloridina</u>	<u>Cefaloridina en presencia de - 5 µg/ml de sal sódica de ácido clavulánico</u>
15 <u>Proteus mirabilis</u> 889	>500*	62	7,5
<u>Staphylococcus aureus</u> (Russell)	15	3,1	<0,03 <sup>+</sup>
<u>Staphylococcus aureus</u> (una cepa resistente a la meticilina)	62	15	3,7

\* Punto de cola

+ Se obtiene el mismo valor cuando el sinergista se agrega en la proporción de 1 µg/ml en lugar de 5 µg/ml.

EJEMPLO 33

Sinergismo antibacteriano entre sal sódica de ácido clavulánico y diversas penicilinas

Los resultados presentados en la Tabla VII se ob-

1 tuvieron por el método descrito en el Ejemplo 42.

TABLA VII

Sinergismo antibacteriano entre la sal sódica del ácido clavulánico y diversas penicilinas contra cepas de

Klebsiella aerogenes

Cepa	<u>Amoxicilina</u>		<u>Carbenicilina</u> <sup>*</sup>		<u>Bencilpenicilina</u>	
	<u>Sola</u>	<u>+5 µg/ml sinergis ta</u>	<u>Sola</u>	<u>+5 ug/ml sinergis ta</u>	<u>Sola</u>	<u>+5 ug/ml sinergis ta</u>
10 A	500	0,97	500	7,8	250	7,8
E 70	500	3,9	500	15	500	15,6
62	250	15,6	125	7,8	250	15,6

<sup>\*</sup> Se observan resultados similares cuando la carbenicilina se sustituye por el α-éster fenílico de carbenicilina o por ticarcilina.

EJEMPLO 34

Extracción del ácido clavulánico utilizando una resina cambiadora de ión líquida

20 Un filtrado de cultivo (200 ml, obtenido de forma similar a la del Ejemplo 3 pero utilizando un medio que contiene 0,1 % en volumen/volumen de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en lugar de 0,01 % de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) se extrae con Amberlite<sup>\*</sup> IA2<sup>+</sup> (forma  $\text{Cl}^-$ , 15 % en volumen/volumen en metil-isobutil-cetona, 25 66 ml), durante 30 minutos a 5°C.

1                    Se separan las fases por centrifugación (1660 g,  
 20 minutos). Se recupera la fase disolvente (60 ml) me-  
 diante una pipeta y se divide en cuatro porciones iguales.  
 Cada porción se extrae agitando a 5°C durante 20 minutos  
 5                    con 1/4 volúmenes (3,75 ml) de extractante acuoso, como  
 indica la siguiente tabla. La mezcla resultante se cen-  
 trifuga (1660 g, 15 minutos). De cada extracción se recu-  
 peran 3,6 ml de fase acuosa.

10	<u>Muestra</u>	<u>Volumen (ml)</u>	<u>Concentración de ácido clavuláni- co (µg/ml )</u>	<u>Acido cla- vulánico, (mg)</u>
	caldo clarificado	200	128	25,4
	caldo extraído	200	15	3,0
	extracto de NaCl M	3,6	305	1,1
	extracto de NaCl 2M	3,6	598	2,5
15	extracto de NaNO <sub>3</sub> M	3,6	638	2,3
	extracto de NaNO <sub>3</sub> 2M	3,6	758	2,73

El resultado obtenido con NaNO<sub>3</sub> 2M representa una  
 recuperación del 43 % a partir del caldo clarifi-  
 cado.

20

\* El Amberlite LA2 puede obtenerse de Rohm and Haas  
 (UK) Ltd. Croydon, Inglaterra.

25

EJEMPLO 35

Extracción del ácido clavulánico utilizando una resina  
cambiadora de ión líquida

El caldo clarificado (47 litros, obtenido como en el Ejemplo 12) se extrae con Amberlite LA2 (forma acetato, 15 % en volumen/volumen en metil-isobutil-cetona, 12,5 litros) agitando durante 1 hora a 17°C. Después de añadir 500 ml de octan-1-ol, se separan las fases en una centrífuga de flujo continuo dando 9,2 litros de fase disolvente, que después se agita a 5°C durante hora y media con 2,3 litros de nitrato sódico 1 M. Se separa la mezcla por centrifugación de flujo continuo dando 2,4 litros de fase acuosa (incluido el agua utilizada para el desplazamiento). El pH de la fase acuosa (inicialmente 8,0) se ajusta a 7,0 con ácido clorhídrico concentrado.

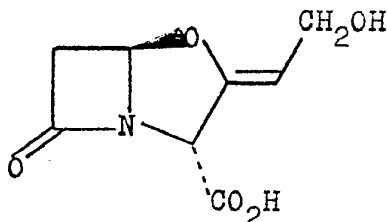
<u>Muestra</u>	<u>Volumen (l)</u>	<u>Concentración de ácido cla- vulánico (µg/ml)</u>	<u>Acido cla- vulánico, (mg)</u>
caldo clarificado	47	146	6862
caldo extraído	47	19	893
extracto de NaNO <sub>3</sub> M	2,4	1638	3931

La eficiencia de extracción del caldo clarificado en el extracto de nitrato sódico es del 57 %.

En resumen, la patente de invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una sal de ácido clavulánico que es el compuesto de fórmula (I):



cuyo procedimiento consiste en poner en contacto un medio de cultivo clarificado que contiene ácido clavulánico o una sal del mismo con una resina cambiadora de anión de base fuerte o débil hasta que el ácido clavulánico o su sal sea absorbida, eluir una sal de ácido clavulánico de la resina utilizando una solución acuosa de un electrolito, desalificar la solución resultante y obtener la sal deseada de ácido clavulánico de la solución.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo clarificado se obtiene del cultivo de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 o un mutante del mismo de gran rendimiento.

3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el electrolito es una sal metálica alcalina.

4. Un procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la sal metálica alcalina es cloruro de litio, cloruro de sodio o cloruro de potasio.

5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindi-

1 caciones 1 a 4 caracterizado porque la solución desalada  
se somete a posterior purificación por cromatografía en  
un disolvente acuoso para dar un producto cristalino.

5 6. Se reivindica por último como objeto sobre  
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-  
ta: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SAL DE  
ACIDO CLAVULANICO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la presente memoria descriptiva que consta de ochenta y  
cinco páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

10

Madrid, 18 Abril 1.975

BERNARDO UNGRÍA

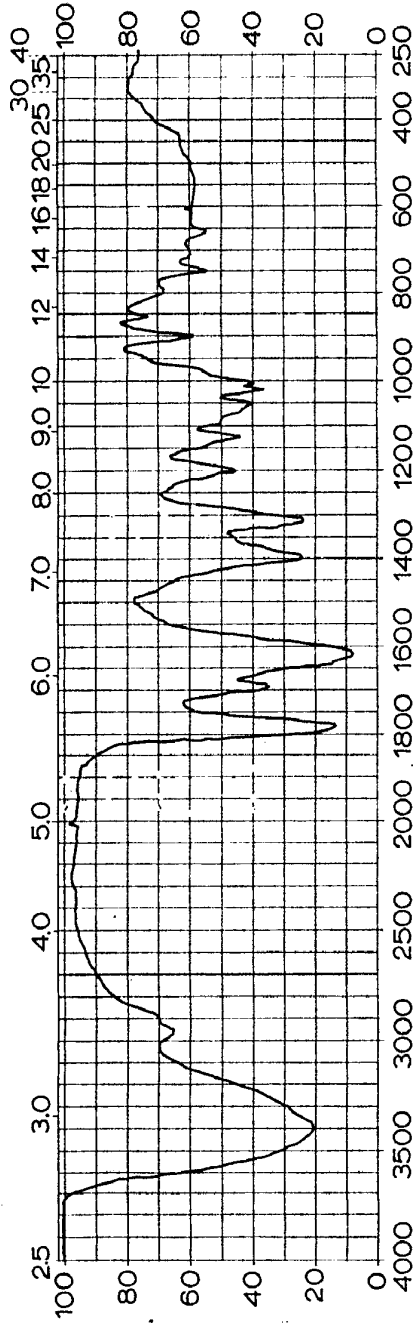
P.P.



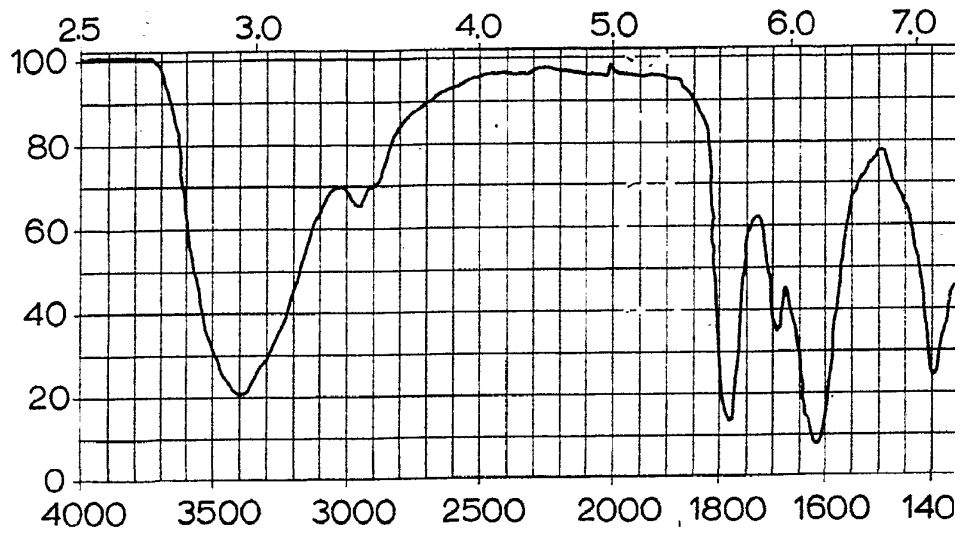
15

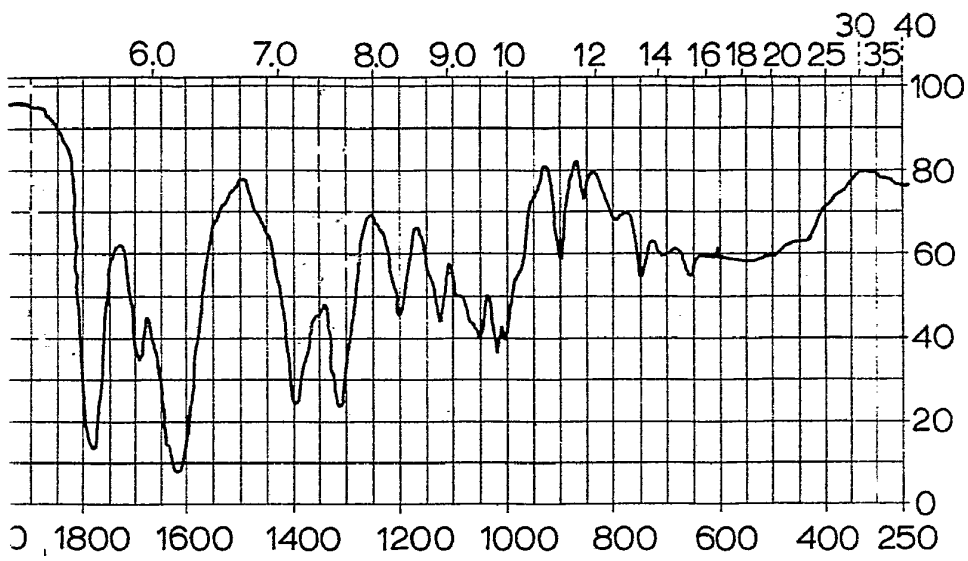
20

25



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 18 de Abril de 1975  
P.P. BERNARDO ANGRIA





ESCALA VARIABLE  
Madrid, 18 de Abril de 1975  
BERNARDO ANGELA  
P-P-