

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



19	ES	11	NÚMERO	10	A3
		21	439.790		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			29 de Julio 1975		

PATENTE DE INTRODUCCION

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL
			C07D // C07G
54	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
	PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA		
59	PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION		
	Patente del Japon nº 47 - 84280 de 22 de Agosto de 1972		
71	SOLICITANTE (S)		
	ANTIBIOTICOS, S.A. - 9 MAR. 1977		
	DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
	Madrid, calle de Bravo Murillo, 38		
72	INVENTOR (ES)		
73	TITULAR (ES)		
74	REPRESENTANTE		
	D. Germán CONZALEZ FORTA, Agente Oficial de la Propiedad Industrial		

439790

PATENTE DE INTRODUCCION

Sobre:

"PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA".

S O L I C I T A N T E : La razón social ANTIBIOTICOS, S.A., de nacionalidad española, domiciliada en la calle Bravo Murillo, 16, MADRID.

Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de cefalotina, es decir ácido 7-(2-tienil acetamido)-cefalosporánico por acilación enzimática de ácido 7-amino cefalosporánico (denominado a efectos del presente 7-ACA). De manera más particular, este invento se refiere al procedimiento enzimático para la producción de cefalotina en el que el 7-ACA se hace reaccionar con ácido tienil acético o un derivado del mismo, en presencia del preparado de enzimas acilante obtenida de una cepa de microorganismo

perteneciente al género *Bacillus*, que produce una enzima acilante del grupo amino del 7-ACA, en medio acuoso. Los preparados de enzima acilante a que nos referiremos en adelante incluyen caldo cultivado, extractos de enzima, preparados de enzima en fase sólida o preparados de enzima insolubles, o similares.

Hasta ahora, la cefalotina ha sido producida por los procedimientos de acilación del 7-ACA por medio del ácido tiamicínico (Patente británica nº 982.252; Patente de los Estados Unidos nº 3.252.973; Patente británica nº 1.206.626; Patente de los Estados Unidos nº 3.536.698).

Sin embargo, estos métodos presentan inconvenientes. Por ejemplo, la acilación química del 7-ACA da lugar a problemas de contaminación inevitables del aire y de las aguas residuales.

Los presentes inventores han hallado que cuando se usa el preparado enzimático derivado del *Bacillus megaterium* B-400 MRL B-5385 en el procedimiento de acilación para producir cefalotina a partir del 7-ACA, se consigue con facilidad la eliminación de la hediondez del aire y la depuración de las aguas residuales.

Por lo tanto, es un objeto del presente invento aportar un proceso enzimático para la producción de cefalotina, útil químicamente, a partir del 7-ACA.

Otro objeto de este invento es aportar un procedimiento, industrialmente atractivo, para la producción de cefalotina, sin causar hediondez ni contaminación del ambiente.

Otro objeto más del presente invento es aportar un proceso para la producción de cefalotina, mediante el uso de un preparado de enzima en fase sólida.

Buscando bacterias productoras de una enzima de acilación que introduzcan un grupo de ácido tienil acético en un grupo amino del 7-ACA, hemos hallado microorganismos pertenecientes al género Bacillus con una potente acción acilante para el grupo amino del 7-ACA, habiéndose producido cefalotina casi cuantitativamente del 7-ACA y el éster del ácido tienil acético.

Para introducir un grupo tienil acetilo en un grupo amino del 7-ACA, se usó ácido tienil acético o un derivado del mismo.

Son ejemplos de estos derivados el éster metílico del ácido 2-tienil acético, el éster metílico del ácido 2-tienil acético y similares.

El microorganismo productor de la enzima de acilación usada en el presente invento puede ser preparado por cultivo aeróbico a 25° - 37° C, durante 12-60 horas en un medio nutritivo que contenga fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, como peptona, extracto de carne, cozn steep liquor, extracto de levadura, levadura seca, nitratos, sales amónicas o similares, una fuente de carbono tal como melazas, glucosa, hidrolizado de almidón o similares, y sales inorgánicas, y si se desea otras sustancias estimuladoras del crecimiento. Para la producción industrial se utiliza en general el cultivo aeróbico sumergido.

La enzima acilante del grupo amino del 7-ACA suele estar presente en general como una excelsina. En cuanto a los preparados de enzima, para la reacción enzimática se pueden utilizar cultivos microbianos, filtrado de cultivo o enzima preparada a partir de ellos.

Además se pueden utilizar para el procedimiento del presente invento siempre que se mantenga la actividad de la enzima acilante, el filtrado de cultivo tratado por procedimientos químicos o físicos, como por ejemplo las enzimas purificadas obtenidas por los

procedimientos conocidos de purificación y separación tales como la salificación, la precipitación fraccionada, la diálisis, la cromatografía de adsorción, la cromatografía de cambio de iones o la filtración por gel del filtrado de cultivo; y los preparados de enzima de fase sólida o las enzimas insolubilizadas preparadas a partir de la adsorción de la enzima de acilación sobre un vehículo inerte que no sea inactivo para los sustratos y no inactive a dicha enzima acilante.

El proceso de acilación tiene lugar por medio de la reacción del 7-ACA con el ácido tienil acético o con un derivado del mismo, en presencia de preparados de enzima acilante. En general se utiliza 7-ACA libre, en una concentración de 0,1 a 20 mg/ml y con preferencia de 2 a 5 mg/ml. El ácido tienil acético no actúa como sustrato en su forma ácida libre, por lo cual se utiliza uno de sus derivados activos, tal como un éster con un alcohol de bajo número de átomos de Carbono, con preferencia metanol. Por lo general, el derivado del ácido tienil acético se usa en un exceso molar de 2 a 20 referido al 7-ACA, siendo la cantidad preferible un exceso molar de 5 a 10. La temperatura de reacción utilizada es en general 30 a 40° C., con preferencia de 35° a 40° C. El pH de la mezcla de reacción se mantiene con preferencia entre 7 y 8. El tiempo de reacción varía, dependiendo de las condiciones, entre 1 y 10 horas, y se puede detener una vez alcanzada la producción más alta de cefalotina.

Quando se acila con el uso de un preparado de enzima en fase sólida, la enzima acilante se adsorbe primero en un soporte. La enzima de acilación puede ser adsorbida añadiendo al filtrado de cultivo de la cepa productora de la enzima de acilación a un soporte.

Los soportes usados de acuerdo con el presente invento se seleccionan teniendo en cuenta las características de los que adsorben la enzima sin inactivar su actividad; la enzima adsorbida no debe ser liberada por lavado; el soporte debe ser inerte para el sustrato y no debe adsorber la cefalotina. Los ejemplos de los soportes que se utilizan con ventaja para adsorber la enzima de una solución acuosa incluyen alúmina activa, tierra de diatomas, arcilla activa, fosfato de calcio, hidroxapatito y similares.

En primer lugar, cuando se adsorbe ésta en el soporte, se recomienda ajustar el pH hasta un nivel estable para la enzima acilante. La operación de la adsorción se puede efectuar por lotes o en columna, siendo preferible la última forma para una reacción enzimática continua. La cantidad de soporte utilizado varía con el volumen de filtrado del cultivo, la potencia de la enzima y la relación de adsorción del soporte. En general, en el caso de una adsorción de tipo de lotes, la cantidad de soporte es de 5 a 15 peso/volumen con relación al de ácido filtrado. En el caso de la operación de tipo continuo, se humedece una columna cargada con el soporte, con agua o con solución tampón que tenga el pH óptimo para la enzima, se hace pasar a su través el caldo cultivado o la solución de enzima y después se lava la columna con agua o con solución tampón con el fin de obtener la preparación de enzima en fase sólida de tipo de columna.

El soporte que contiene la enzima acilante adsorbida, es decir un preparado de enzima en fase sólida, puede desnaturalizarse o perder su actividad si se seca demasiado, por lo tanto se debe mantener húmedo.

Entonces se hace reaccionar al 7-AGA con ácido tienil acético o con un derivado del mismo en presencia de un preparado de enzima en fase sólida como la concentración del sustrato puede variar principalmente con arreglo a la potencia de la enzima o al regimen de flujo a través de la columna, se debe regular de mane-
5 ra que no haya 7-AGA sin reaccionar ni ácido tienil acético en el eluato. La reacción de acilación se debe realizar al pH óptimo y a la mejor temperatura para la actividad de la enzima.

En el caso de la operación del tipo de columna, el tiempo de reacción se pueda ajustar cambiando el volumen efluyen-
10 te del sustrato. Por lo general, la reacción se puede llevar a cabo por medio del paso a través de una columna de un preparado de enzima en fase sólida y la operación continua se puede desarro-
llar con facilidad añadiendo continuamente los sustratos. Sin em-
15 bargo, si se encuentran sustratos en el efluente, se debe reducir el regimen de éste o bien debe ser reciclado a través de la columna. Estos procedimientos se pueden sistematizar mediante pro-
cesos industriales automáticos controlados. Cuando decrece o se pierde la actividad de la enzima, la operación se debe dar por
20 terminada.

La cefalotina producida se separa por medio de procedimientos conocidos de separación.

VALORACION DE LA CEFALOTINA

Las soluciones conteniendo cefalotina se valoran mi-
25 crobiológicamente utilizando el método de discos de papel o el de cilindros, con Bacillus subtilis PCI-219, durante 16 horas,

a 37° C. El halo de inhibición resultante es un índice de la potencia de la cefalotina que se calcula con referencia a una curva patrón de cefalotina.

Dados los ejemplos que siguen con el fin de ilustrar el presente invento:

Ejemplo 1

Durante 20 minutos, a 120° C, en un matraz de 500 ml, se esterilizaron 100 ml de medio acuoso (pH 7,0), conteniendo un 1 por ciento de peptona, un 1 por ciento de extracto de carne, y un 0,5 por ciento de cloruro sódico.

Se inoculó *Bacillus megaterium* B-400 NRRL N-5185, y con agitación de wivén se cultivó a 30° C durante 48 horas. El caldo de cultivo filtrado se ajustó a pH 7,5, se añadió 1 gr de celite (producto de Johns-Manville Sales Inc., USA), y se agitó durante 30 minutos. El portador filtrado se lavó con tampón de fosfatos 0,1 M (pH 7,5), y a continuación se añadió una mezcla de 2,5 ml de solución acuosa al 0,5 por ciento de 7-ACA, 2,5 ml de éster metílico de ácido 2-ticnil acético, y 7,5 ml de tampón de fosfatos (pH 7,5), y se agitó durante 30 minutos a 37° C. Después de la reacción, se separó el soporte y el filtrado se ensayó por cromatografía de capa fina en gel de sílice, dando una mancha de Rf 0,54, utilizando un medio para el desarrollo de benceno - acetona, ácido acético (40:56:4) que era idéntico al del producto patrón de cefalotina. La producción de cefalotina fue del 75 por ciento.

Ejemplo 2

4 litros de filtrado de caldo de cultivo obtenido en esencia por el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 1, se ajustaron a pH 7,5, se añadieron 40 g de celite y se renovó durante

30 minutos. El mencionado soporte se introdujo en una columna (diámetro 2,0 cm) dotada de camisa exterior, se lavó con tampón fosfatos 0,1 M (pH 7,5) y se pasó a su través 400 ml de tampón de fosfatos 0,1 M (pH 7,5) conteniendo el 0,25 por ciento de 7-ACA, y el 2,5 por ciento de éster metílico del ácido 2-tianil acético, en un espacio de 30 minutos. El eluato se concentró hasta 1/10 del volumen, se ajustó a pH 2 y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con agua y solución de cloruro sódico saturado y posteriormente fue deshidratada con sulfato sódico anhidro. Después de la filtración se añadieron 3 ml de solución en acetato de etilo de 2-etilhexanoato sódico al 30 por ciento, y a continuación se enfrió con hielo para precipitar la sal sódica del producto. El precipitado se lavó con acetato de etilo y se secó. El rendimiento fue de 1,0 g.

El espectro IR del producto fue idéntico al de una muestra conocida de sal sódica de cefalotina.

Ejemplo 1

Se sembraron 600 litros de medio (pH 7,0) conteniendo un 1 por ciento de glucosa, un 1 por ciento de poptona, un 1 por ciento de extracto de carne y un 0,5 por ciento de $CaCl_2$, con 30 litros de caldo de cultivo sembrado de *Bacillus megaterium* B-400 NRRL B-5385, cultivándose en profundidad con aireación durante 72 horas a 26° C. Después de la fermentación se obtuvieron por centrifugación 580 litros de caldo filtrado. El filtrado se ajustó a pH 7,5, se le añadieron 6 kg de calita, y después se agitó durante 40 minutos. El soporte con la enzima adsorbida se empaquetó en una columna (12 cm de diámetro) con camisa. La columna se lavó con tampón fosfatos de pH 7,5 0,1 M, pasándose a través de ella la mezcla que

5 contenía 1 kg de 7-ACA (10mg/ml), 15 litros del éster metílico del ácido 2-tionil acético, y 100 litros de tampón de fosfatos, 0,1 M (pH 7,5), con una velocidad específica de 0,5. El eluato se lavó dos veces con 20 litros de acetato de etilo y la columna de celite también fue lavada con 15 litros de acetato de etilo. Se desechó el acetato de etilo y la capa acuosa se ajustó a pH 1 - 2 por adición de CaH_2O_8 . Dicha capa acuosa se extrajo de nuevo dos veces con 20 litros de acetato de etilo y se secó al vacío para obtener 1,86 kg de cefalotina pura (pureza 80 por ciento); el rendimiento general fue del 96 por ciento. El producto crudo se recriсталizó para obtener 1,34 kg de producto cristalino. (Pureza, 98 por ciento; rendimiento total, 85 por ciento).

10

REIVINDICACIONES

15 1ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA", que consiste en la reacción del ácido 7-amino cefalosporánico con un éster del ácido 2-tionil acético en un medio acuoso, en presencia de una enzima acilante del grupo amino del 7-ACA, derivada de *Bacillus megaterium* NRRL B-5185.

20 2ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA", de conformidad con la reivindicación 1 en el que la enzima acilante es caldo cultivado de dicho *Bacillus megaterium*, su filtrado o enzima preparada a partir del mismo.

25 3ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA", de conformidad con la reivindicación 1 en el que la enzima acilante es un preparado de enzima insolubilizado.

4ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA", de conformidad con la reivindicación 1 en el que el preparado de la enzima insolubiliza-

da es un soporte adsorbido con caldo cultivado de *Bacillus megaterium* NRRL B-5385, con su filtrado o con la enzima acilante, preparada del mismo.

5 5ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA", según la reivindicación 4, en el que el soporte se selecciona entre el grupo formado por tierra de diatomeas, arcilla activa, alúmina, fosfato de calcio e hidroxapatito.

10 6ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA", de conformidad con la reivindicación 1 en el que la reacción se lleva a cabo a 35° a 40° C, a pH 7 a 8, con una concentración de ácido 7-amino cefalosporánico de 0,1 - 20 mg/ml, y una concentración de éster del ácido 2-tienil acético en exceso molar de 5 a 10 con relación al ácido 7-amino cefalosporánico.

7ª.- "PRODUCCION ENZIMATICA DE CEFALOTINA".

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de DIEZ hojas a máquina por una sola cara.

Madrid, 29 JUL. 1975

Germán González Porta
p. p.



Fdo: Alejandro Martínez Delso