



ESPAÑA



19	ES	11	NUMERO	444948	10	A1
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	6-2-76		

P.- 62.284
25.118-530

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
5409/75 11076/75	7-2-75 17-3-75	Gran Bretaña
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D / A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE IMPUREZAS CONTAMINANTES DEL ACIDO CLAVULANICO"		
71 SOLICITANTE (S)		
GLAXO LABORATORIES LIMITED		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Greenford, Middlesex, Inglaterra		
72 INVENTOR (ES)		
Ian Dunlop Fleming, David Noble, Hazel Mary Noble y Wilfred Frank Wall.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ		



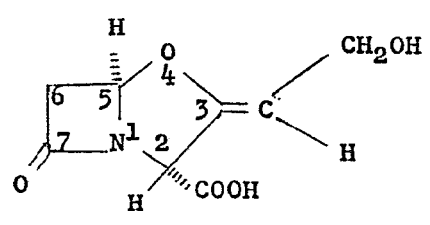
P.- 62.284
25.118-530

5 Este invento se refiere a un nuevo anti-
biótico y sus sales y a un procedimiento para su produc-
ción en forma pura.

Se sabe que la fermentación del Streptomyces clavuligerus, y en particular la cepa NRRL 3585 produce cierto número de sustancias antibióticas y así la memoria de la patente británica nº 1.315.177 describe y reivindica el cultivo de Streptomyces clavuligerus cepa NRRL 3585 hasta que se produce una cantidad sustan-
10 cial de dos antibióticos, denominados Antibióticos A 16886 I y A 16886 II.

15 Se ha encontrado ahora que puede obtenerse un antibiótico más a partir de este organismo, esto es, el ácido (2R, 5R, Z)-3-(2-hidroxietiliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3,2,0]heptan-2-carboxílico que tiene la fórmula I

20



I

25



denominado en lo sucesivo por conveniencia "ácido clavulánico". El presente invento incluye este compuesto y también sus sales.

5 Las sales de acuerdo con este invento incluyen las sales de metales alcalinos, por ejemplo sales de sodio, potasio y litio; sales de metales alcalino-térreos, por ejemplo sales de calcio, magnesio y bario; la sal de amonio; y sales de bases orgánicas por ejemplo sales derivadas de aminas primarias, secundarias,
10 terciarias o N-cuaternarias, por ejemplo sales de monoalcoholammonio, dialcoholammonio o trialcoholammonio, tales como sales de metilammonio y trietilammonio y sales de bases heterocíclicas tales como sales de piperidinio.

15 Las sales de bases inorgánicas y la mayor parte de las sales de bases orgánicas, son en general, más estables en solución acuosa que el ácido clavulánico libre. Las sales pueden existir en forma de solvatos, es decir que tienen agua y/o otro disolvente de cristalización.

20 Se ha obtenido el ácido clavulánico y sus sales con una pureza de al menos 75% y en general al menos 85%, es decir que tienen no más del 25% y generalmente no más del 15%, en peso de impurezas e isómeros que provienen de la producción.

25 Además, empleando las técnicas descri-



tas a continuación, se han obtenido sales del ácido clavulánico en un grado incluso superior de pureza, estando sustancialmente libres de impurezas e isómeros que provienen de la producción, por ejemplo teniendo puras del 98% o superiores, es decir que contienen menos del 2% en peso de impurezas o isómeros que provienen de la producción. Así se ha preparado clavulanato de litio y otras diversas sales clavulanatos en forma cristalina. Estas sales son sustancialmente puras como se muestra per los coeficientes de extinción molar, determinados a 259 \pm 1 nm en hidróxido de sodio acuoso 0,1 M, de al menos 16.200. Las rotaciones molares, valores $\frac{[\alpha]_D^{24}}{D}$ en solución acuosa, fueron de $+1372 \pm 52$. El ácido libre, cuando se prepara a partir de sus sales, ha mostrado un coeficiente de extinción, $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ en hidróxido de sodio acuoso 0,1M, a 259 nm de 590 o mayor y una rotación óptica específica $\frac{[\alpha]_D^{24}}{D}$ en sulfóxido de dimetilo de aproximadamente $+542$. Se apreciará que la producción de material de este nivel de pureza permite emplear los productos en composiciones farmacéuticas y veterinarias y es muy deseable para el empleo de los materiales como productos intermedios.

El término "pureza" tal como se emplea en esta memoria se refiere al porcentaje de ácido clavulánico y/o una de sus sales expresado en términos de sólido



dos totales presentes sobre una base de peso, pero exclu-
yendo el agua asociada u otros disolventes.

5 El ácido clavulánico y sus sales tienen actividad antibacteriana frente a una gama de microor-
ganismos gram-negativos y gram-positivos, por ejemplo
frente a las cepas de Staphylococcus aureus, Escheri-
chia coli, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, En-
terobacter cloacae, Klebsiella aerogenes, Proteus mira-
bilis, Proteus morgani, Serratia marcescens, especies
10 Providencia, Citrobacter koseri, Haemophilus influen-
zae y especies Bacteroides.

El ácido clavulánico y sus sales son esta-
bles a la acción de β -lactamasas producidas por organis-
mos gram-positivos, por ejemplo las producidas por Sta-
15 phylococcus aureus y Bacillus cereus y a las β -lactama-
sas producidas por organismos gram-negativos en las cla-
ses I-V descritas por Richmond, M.H. y Sykes, R.B. (1973).
("The β -lactamases of gram-negative bacteria and their
possible physiological role". Advances in Microbial Phy-
20 siology, 2, 31-88).

El ácido clavulánico y sus sales poseen
también capacidad para inhibir las enzimas β -lactamasas
producidas por organismos gram-positivos, por ejemplo
las producidas por cepas de Staphylococcus aureus y Ba-
25 cillus cereus y también las enzimas clasificadas en las



clases II-V de bacterias gram-negativas producidas por organismos tales como cepas de Proteus mirabilis, Escherichia coli, Proteus morgani, Klebsiella aerogenes, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei y Haemophilus influenzae.

5

También se inhiben cierto número de enzimas de clases I, por ejemplo las producidas por cepas de Bacteroides fragilis, Proteus vulgaris, Proteus morgani, Proteus rettgeri, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, especies Providencia Hafnia alvei. Así el ácido clavulánico y su sales tienen la capacidad de proteger los antibióticos de β -lactama susceptibles a la β -lactamasa de la hidrólisis por β -lactamasa.

10

El ácido clavulánico y sus sales son de interés para emplear junto con los antibióticos de β -lactama que muestran susceptibilidad a las β -lactamasas tanto de los organismos gram-positivos como de los organismos gram-negativos.

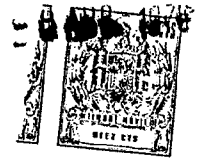
15

Generalmente se prefieren emplear sales del ácido clavulánico, que tienen una pureza de al menos 98%, es decir que contienen menos de 2% de impurezas o isómeros que provienen de la producción, excepto de disolventes, en unión con un antibiótico de β -lactama de amplio espectro.

20

25

En general, el ácido clavulánico y sus sa



les pueden emplearse en combinación con antibióticos de β -lactama que se administran normalmente bien por vía oral o parenteral. Ejemplos de antibióticos de β -lactama de amplio espectro absorbidos oralmente incluyen la cefalexina, cefaloglicina, ampicilina y amoxicilina y sus ésteres absorbidos oralmente, por ejemplo los ésteres acileximetílico y ftalidílico y los ésteres absorbidos oralmente de carbenicilina y ticarcilina, por ejemplo los ésteres indanílico y fenílico. Los antibióticos de β -lactama de amplio espectro que no son absorbidos oralmente incluyen carbenicilina, ticarcilina, cefalotina, cefaloridina, cefazolina, cefacetrilo y cefapirina. Ejemplos de antibióticos de β -lactama de espectro estrecho son penicilina G y penicilina V.

Las combinaciones del ácido clavulánico y sus sales con por ejemplo penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, cefaloridina o ticarcilina han mostrado actividad sinérgica frente a la β -lactamasa que producen las cepas de Staphylococcus aureus.

Las combinaciones del ácido clavulánico y sus sales con, por ejemplo penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, cefalexina, cefaloglicina, cefalotina, cefaloridina, cefazolina, cefacetrilo o cefapirina muestran actividad si-



nérgica frente a la β -lactamasa que producen las cepas de Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Proteus mirabilis, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Bacteroides fragilis, Proteus morganii y Proteus vulgaris.

5 Per consiguiente de acuerdo con un aspecto adicional del presente invento, se proporcionan composiciones farmacéuticas (que incluyen composiciones veterinarias) que contienen ácido clavulánico, o más preferiblemente una de sus sales farmacológicamente aceptables, por ejemplo la sal de sodio de dicho ácido y/o sal que contiene menos de 2% de impurezas o isómeros que derivan de la producción, excepto de disolventes.

10 En vista de la acción protectora antes descrita, las composiciones pueden contener ventajosamente además antibióticos de β -lactama. Las composiciones contendrán también normalmente un vehículo o excipiente farmacéutico (incluyendo de tipo veterinario).

15

La composición puede formularse para administración oral, parenteral, recta o tópica.

20 Las composiciones pueden tomar, por ejemplo, la forma de polvos, tabletas, cápsulas, trociscos, soluciones y jarabes adecuados para administración oral y pueden incluir por ejemplo, almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, gelatina, agua destilada y agentes de suspensión, agente de dispersión, emulsificantes,

25



aromatizantes y colorantes.

5 El ácido clavulánico y sus sales pueden formularse también para administración parenteral, prefiriéndose este modo de administración. Los compuestos pueden así formularse en ampollas para reconstitución antes del uso, opcionalmente junto con un compuesto anti-
biótico de β -lactama adicional.

10 En general, la relación en peso de ácido clavulánico o su sal a un antibiótico de β -lactama que ha de protegerse estará en el intervalo de 10:1 a 1:10, más preferiblemente 5:1 a 1:5, especialmente 2:1 a 1:2.

15 De acuerdo con otro aspecto más del invento se proporciona un método de combatir infecciones originadas por organismos gram-positivos y/o gram-negativos en el cual una cantidad eficaz de ácido clavulánico o, más preferiblemente una de sus sales farmacológicamente aceptable, conteniendo dicho ácido y/o sal menos de 2% de impurezas o isómeros que derivan de la producción, excepto de disolventes, se administra a un sujeto humano o animal ya sea profiláctica o terapéu-
20 ticamente.

En general, el material activo se administrará junto con un antibiótico de β -lactama adicional por las razones antes explicadas.

25 El ácido clavulánico y/o la sal puede ad-



ministrarse a los adultos en un nivel de dosificación de 100 mg a 6 g, dado de 2 a 4 veces diarias. Cuando la composición contiene un antibiótico de β -lactama adicional, las cantidades anteriores se aplican a la cantidad total del antibiótico de β -lactama presente. La dosis preferida de ácido clavulánico y/o una de sus sales administrada sola o con un antibiótico de β -lactama adicional es de 250 mg a 1 g, dado de 2 a 4 veces diarias.

Una utilidad adicional del ácido clavulánico y sus sales es la producción de derivados tales como ésteres, por ejemplo, por reacción del ácido con un diazoalcano tal como diazometano o una sal del ácido con un haluro de alcoholo por ejemplo yoduro de metilo.

PURIFICACION DEL ACIDO CLAVULANICO Y SUS SALES

El ácido clavulánico y sus sales pueden aislarse de un caldo de fermentación, preparado por cultivo, de acuerdo con la Memoria descriptiva de la patente británica N^o 1.315.177, de una cepa de Streptomyces clavuligerus por ejemplo la cepa NRRL 3585 o uno de sus mutantes, efectuándose el aislamiento empleando técnicas de fraccionamiento para eliminar los componentes indeseables del caldo, tal como proteínas y enzimas y en particu



lar, otros antibióticos de β -lactama. Sin embargo, dicha purificación es difícil empleando técnicas convencionales, debido particularmente al comportamiento similar de los diversos ácidos carboxílicos de β -lactama presentes, tales como los Antibióticos A 16886 I y II antes citados. Se ha encontrado que el aislamiento del antibiótico se facilita mucho por conversión del ácido clavulánico o una de sus sales en clavulanato de litio y precipitación de esta última, normalmente en forma cristalina. Dicha precipitación puede efectuarse, debido posiblemente a la sorprendentemente elevada afinidad de los iones clavulanato para los iones litio, con poca o ninguna co-precipitación significativa de impurezas, especialmente otras β -lactamas. Además, por aislamiento directo de una sal, evitando la conversión del ácido clavulánico en derivados orgánicos tales como ésteres con subsiguiente reconversión al ácido por ejemplo por técnicas de reducción, puede evitarse la transposición del ácido clavulánico a isómeros. Se ha observado que puede producirse la escisión reductora de los ésteres del ácido clavulánico tanto como el 15% del material isómero.

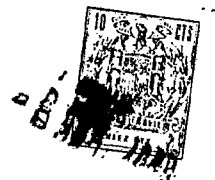
Debe observarse que en los caldos de fermentación y otras soluciones a aproximadamente pH neutro, existirán en equilibrio el ácido clavulánico y las sales formadas con uno o más cationes y los procedimientos de



aislamiento se efectuarán frecuentemente en el ácido clavulánico y/o o una de sus sales dependiendo del pH y otras condiciones. En general, el ácido clavulánico y sus sales son bastante inestables en solución acuosa fuera del intervalo de pH de 5,5 a 8 y durante los procedimientos descritos más adelante es deseable mantener el pH dentro de este intervalo y preferiblemente próximo a aproximadamente pH 6,5, a no ser que se indique otra cosa.

10 Por consiguiente de acuerdo con un aspecto adicional del presente invento se proporciona un procedimiento para la separación de impurezas contaminantes del ácido clavulánico de fórmula I, y/o una de sus sales, con lo cual dicho ácido y/o su sal se hace reaccionar con un compuesto de litio iónico y acuoso para proporcionar una solución acuosa que contiene clavalanato de litio que se precipita luego y el precipitado se separa de dicha solución acuosa.

20 En general el compuesto de litio iónico es una sal. Se prefiere el cloruro de litio, pero también son adecuados el bromuro, yoduro o sulfato de litio o los carboxilatos de litio tal como acetato, propionato, formiato, benzoato o lactato de litio. La elección de la sal puede estar influenciada por los otros materiales presentes y por ejemplo, cuando la sal de



ácido clavulánico inicialmente presente es la sal de bario, puede preferirse el sulfato de litio para efectuar una precipitación preliminar del sulfato de bario antes de la precipitación del clavulanato de litio.

5 En general se prefiere que la concentración del clavulanato de litio antes de la precipitación sea al menos 0,1% en peso, ventajosamente al menos 2%, y concentraciones mayores, por ejemplo hasta el 12% e incluso hasta el 20% en peso, dan naturalmente recuperaciones de porcentajes mayores.

10 La sal del ácido clavulánico inicialmente presente, y que requiere purificación, puede ser por ejemplo una sal de metal alcalino (tal como la sal de sodio o potasio o incluso la sal de litio si este está presente como un componente secundario del material de ácido clavulánico), una sal de metal alcalino-térreo (por ejemplo la sal de calcio, bario, o magnesio) o una sal de una base orgánica como se ha descrito antes o una sal formada con una resina básica de intercambio iónico.

15 El descubrimiento de que el clavulanato de litio precipita fácilmente en un elevado estado de pureza puede emplearse en un gran número de campos.

SEPARACION POR SALIFICACION DEL CLAVULANATO DE LITIO

20 De acuerdo con una realización del proce-



dimiento, la solución acuosa que contiene clavulanato de litio puede contener también una cantidad suficiente de un compuesto de litio iónico, generalmente la sal de litio empleada para formar el clavulanato de litio, para separar por salificación éste último elevando la concentración de los iones de litio de modo que se exceda ampliamente el producto de solubilidad del clavulanato de litio a la temperatura implicada. Puesto que el clavulanato es menos soluble a temperaturas inferiores normalmente es conveniente reducir la temperatura de la solución para hacer máxima la precipitación, por ejemplo hasta aproximadamente 0-5°C.

Para dicha separación por salificación, la concentración del compuesto de litio iónico en la solución acuosa que contiene el clavulanato de litio está preferiblemente en el intervalo de 4M a 10M, aunque son útiles concentraciones hasta saturación; un intervalo más preferido es 5M a 8M.

Puede ser ventajoso, después de recoger una primera cosecha de clavulanato de litio, concentrar más y recoger una segunda cosecha.

"CONVERSION DE OTROS CLAVULANATOS EN CLAVULANATOS DE LITIO"

La solución que contiene clavulanato de li



5 tie puede formarse simplemente disolviendo una sal de
 ácido clavulánico distinta de la sal de litio, por
 ejemplo una sal de sodio, potasio, magnesio, bario, cal
 cio o amonio, en una solución acuosa e incluyendo en
10 ella una sal de litio soluble en agua tal como cloruro
 de litio. En el caso de la sal de bario, el empleo de
 una elevada concentración de cloruro de litio puede dar
 como resultado algo de co-precipitación del cloruro de
 bario con el clavulanato de litio. El cloruro de bario
15 sin embargo, puede eliminarse fácilmente por redisolu-
 ción de la mezcla en agua y adición de sulfato de litio
 para precipitar sulfato de bario, que puede separarse,
 por ejemplo, por filtración, seguido por adición de clo-
 ruro de litio para precipitar el clavulanato de litio
 puro.

FORMACION DE CLAVULANATO DE LITIO EN UNA RESINA DE IN-
TERCAMBIO IONICO

20 De acuerdo con una aplicación particular
 mente útil del invento, la sal de ácido clavulánico em-
 pleada inicialmente es una sal con una resina básica
 de intercambio iónico y ésta se pone en contacto con
 una solución acuosa de una sal de litio para proporcio-
25 nar una solución acuosa de clavulanato de litio. La re-



5 sina se empleará normalmente en forma de una columna sobre la que se carga el ácido clavulánico impuro y/o una de sus sales y de la que se eluye una solución acuosa de clavulanato de litio, empleando una solución acuosa de una sal de litio soluble en agua, por ejemplo cloruro de litio. La resina se lavará normalmente, por ejemplo con agua, antes de la elución.

10 La resina llevará generalmente grupos amino o amino terciarios (debilmente básicos) o grupos de amonio cuaternario (fuertemente básicos). La resina puede ser, por ejemplo, una resina de poliestireno, poliacrílica, de epoxi-poliamina, de poliamina fenólica o de dextrano reticulado y puede ser macroreticular o microreticular.

15 El término "resina" se emplea en la presente memoria por conveniencia incluyendo también derivados celulósicos y los derivados de dextrano anteriores que son derivados de polímeros que existen en la naturaleza. Las resinas débilmente básicas de intercambio iónico típicas incluyen Amberlite IRA68 (Microreticular: poli
20 liacrilato reticulado con divinilbenceno: grupos amino terciarios), Amberlite IRA93 (Macroreticular: poliestireno reticulado con divinilbenceno: grupos amino terciarios) vendidas todas por Rohm & Haas (G.B.) Ltd. Las resinas fuertemente básicas de intercambio iónico típicas in
25

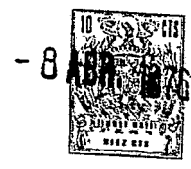


cluyen Zerolit FF y Zerolit FF (iP) (vendida por Zerolit Co. Ltd.).

5 Las resinas básicas de intercambio iónico están ventajosamente en forma de sal cuando se ponen en contacto con el ácido clavulánico impuro y/o su sal; el anión es preferiblemente el mismo que el de la sal de litio usada como eluyente, convenientemente el ión cloruro, pero pueden emplearse aniones diferentes sin efectos significativamente adversos.

10 La concentración de la sal de litio acuosa empleada como eluyente está preferiblemente en el intervalo de 0,02 M a 8 M, sin embargo, las concentraciones inferiores dan soluciones muy diluidas de clavulanato de litio y hacen más difícil la precipitación subsiguiente. En general las concentraciones se prefieren en el intervalo de 0,5 a 2,5 M.

20 Aunque las técnicas de adsorción/elución se llevan a cabo convenientemente de tal modo que el producto deseado se someta a un tipo de cromatografía de separación del otro material adsorbido, se ha encontrado que la etapa subsiguiente de precipitación es tan eficaz en la separación del clavulanato de litio de las impurezas indeseables, que generalmente se prefiere separar de modo sustancial la columna empleando concentraciones relativamente elevadas de sal de litio en el eluyente. Esto da una ban



da estrecha de clavulanato en la columna que puede eluirse en un volumen relativamente pequeño de eluato, facilitando así la precipitación subsiguiente.

5 El eluato contendrá normalmente la sal de litio, por ejemplo cloruro de litio, a una concentración en el intervalo de 0,5 a 2,5 M mientras, que como se ha indicado antes, la separación por salificación efectuada es más eficaz a concentraciones en el intervalo de 5M a 10M. Por consiguiente es preferible concentrar el eluato, por ejemplo por evaporación a vacío, por ejemplo, por un factor de aproximadamente 5. La solubilidad del clavulanato de litio a aproximadamente 20°C en diversas concentraciones de cloruro de litio acuoso se da la Tabla siguiente:

15

TABLA 1

	<u>Molaridad de LiCl</u>	<u>Solubilidad en mg/ml del clavulanato de litio (aproximada)</u>
20	2,5	23,5
	3,75	10,2
	5,0	4,1
	6,25	1,8
	7,5	0,8

25

La etapa anterior de concentración es pre-



ferible a la adición de más sal de litio puesto que el clavulanato de litio también se concentra y las pérdidas en las aguas madres son así mínimas.

5 Con el fin de hacer mínima la elución de las impurezas adsorbidas de la resina, puede ser ventajoso incluir en el eluyente un disolvente orgánico miscible en agua a concentración elevada. Alternativamente, después de la elución en ausencia de dicho disolvente, puede añadirse éste al eluato para precipitar las impurezas eluidas y el precipitado separarse antes de más
10 tratamiento. El disolvente puede, por ejemplo, ser una cetona tal como acetona, un alcohol tal como metanol, etanol, alcohol isopropílico o etilenglicol, un éter tal como dioxano o tetrahidrofurano o un disolvente de
15 amida sustituida, imida o sulfóxido tal como dimetilformamida o sulfóxido de dimetilo. En general, se prefieren los alcoholes como tales disolventes, por ejemplo etanol o alcohol isopropílico.

20 Para dicha separación de las impurezas indeseables, la concentración preferida de alcohol en el eluyente o en el eluato después de la adición de alcohol es de 70 a 97% en volumen.

25 PRECIPITACION DEL CLAVULANATO DE LITIO EMPLEANDO UN DISOLVENTE MISCIBLE EN AGUA

3.2.76



Debe observarse que si la concentración del disolvente orgánico miscible en agua y las sales de litio en el procedimiento anterior es demasiado elevada, el clavulanato de litio puede precipitarse prematuramente. En efecto es posible precipitar el clavulanato de litio de una solución acuosa empleando concentraciones muy elevadas de dichos disolventes, con lo cual se proporciona un procedimiento alternativo teniendo la ventaja de los beneficios de la precipitación selectiva del clavulanato de litio antes indicada. Así, el ácido clavulánico y/o una de sus sales puede ponerse en contacto con una sal de litio a una concentración relativamente baja, ya sea por elución desde una columna o por disolución de las sales en una solución única, y la precipitación deseada efectuada sin concentración por adición del disolvente miscible en agua. Así, por ejemplo, las concentraciones de alcohol de al menos 90% en volumen, preferiblemente al menos 95% son eficaces para precipitación del clavulanato de litio. Puede ser necesario recoger una primera cosecha de clavulanato de litio y luego concentrar a vacío, por ejemplo aproximadamente 4 veces, para obtener una segunda cosecha.

25 PREPARACION DE SAL DEL ACIDO CLAVULANICO CON RESINA DE INTERCAMBIO IONICO



La resina básica de intercambio iónico citada antes puede cargarse con el ácido clavulánico y/o su sal, por aplicación directa de un caldo de fermentación del cual puede haberse separado previamente el material sólido, por ejemplo, por filtración o centrifugación. Existe esta posibilidad debido a la notable purificación efectuada por la etapa subsiguiente de precipitación del litio. Sin embargo, puede ser preferible tratar el caldo, después de separar los sólidos, con carbón vegetal adsorbente para adsorber el ácido clavulánico y/o su sal; esto ayuda a separar otras sales del clavulanato y evita cargar indebidamente la resina básica de intercambio iónico con material iónico indeseable.

En general, el caldo clarificado puede hacerse pasar a través de un lecho de carbón vegetal, por ejemplo en una columna, empleando preferiblemente justo el suficiente carbón vegetal para adsorber todo el ácido clavulánico deseado y/o su sal, generalmente en una relación de aproximadamente 1 parte por volumen de carbón vegetal a 3-10 partes por volumen de caldo clarificado. Es adecuado el carbón vegetal ordinario y no hay necesidad de emplear material muy activado.

El carbón vegetal puede separarse luego con un disolvente acuoso miscible en agua, por ejemplo



una cetona tal como metiletilcetona, metilisobutilcetona o, preferiblemente acetona, ventajosamente a una con
centración de 30% a 95% de cetona, preferiblemente de
50 a 70%. Antes de la separación, el carbón vegetal se
5 lava preferiblemente, por ejemplo con agua, para elimi
nar los componentes del caldo residual.

Otra variación del procedimiento ante-
rior es preparar una sal de resina del ácido clavuláni-
ce, como se ha descrito antes, y eluir ésta con una
10 sal distinta de una sal de litio, por ejemplo una sal
de sodio, potasio, magnesio o calcio, por ejemplo un
cloruro o acetato, o una sal de amonio o piridinio, por
ejemplo formiato o acetato de amonio o clorhidrato de
piridina, para proporcionar una solución acuosa del cla-
15 vulanato correspondiente; puede añadirse luego al elua-
to un exceso de una sal de litio soluble en agua y el
clavulanato de litio precipita como se ha descrito an-
teriormente.

20 FERMENTACION DE STREPTOMYCES CLAVULIGERUS

La producción de ácido clavulánico a par-
tir de Streptomyces clavuligerus puede efectuarse por me-
dios convencionales, es decir cultivando el Streptomyces
25 clavuligerus en presencia de fuentes asimilables de car-



bono, nitrógeno y sales minerales. El cultivo se llevará a cabo preferiblemente por cultivo sumergido en condiciones aerobias.

5 Pueden proporcionarse fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y minerales por nutrientes bien sencillos o complejos. Las fuentes de carbono incluirán generalmente glucosa, almidón, glicerina, molasas, dextrina, lactosa o sacarosa.

10 Las fuentes de nitrógeno incluirán generalmente harina de soja, líquidos de macerado de maíz, productos solubles de recuperación de desperdicios de la fabricación de alcohol, extractos de levadura, harina, de semilla de algodón, peptonas, caseína o mezclas de aminoácidos. Pueden también emplearse urea y otras amidas.

15 Las sales de nutrientes mineral que pueden incorporarse en el medio de cultivo incluyen las sales generalmente empleadas capaces de proporcionar iones sodio, potasio, amonio, hierro, magnesio, zinc, níquel, cobalto, manganeso, calcio, fosfato, sulfato, cloruro y
20 carbonato.

Generalmente estará presente un antiespumante para controlar la formación excesiva de espuma y puede añadirse según se requiera a intervalos.

25 El cultivo del Streptomyces clavuligerus se efectuará generalmente a una temperatura de 20-37°C,



preferiblemente desde 25-30°C, y tendrá lugar deseablemente con agitación, por ejemplo, sacudiendo o bien agitando y aireación. El medio de desarrollo puede inocularse inicialmente con una pequeña cantidad de suspensión esperulada del microorganismo, pero con el fin de evitar un retraso del desarrollo puede prepararse un inóculo vegetativo del organismo, inoculando una pequeña cantidad de medio de cultivo con la forma de esporas del organismo, y el inóculo vegetativo obtenido puede transferirse al medio de fermentación o más preferiblemente a una etapa de siembra en donde tiene lugar el desarrollo adicional antes de transferir al medio de fermentación principal.

El microorganismo es una cepa de Streptomyces clavuligerus. Se ha encontrado que la cepa NRRL 3585 y sus mutantes son cepas particularmente satisfactorias para la producción del ácido clavulánico.

Por consiguiente en una realización preferida de la fermentación, puede emplearse un cultivo en pico de flauta de Streptomyces clavuligerus NRRL 3585 o uno de sus mutantes para inocular un medio que comprende fuentes de carbono asimilables por ejemplo sacarosa o glicerina, nitrógeno asimilable, por ejemplo triptonas, o mezclas complejas de carbono y nitrógeno asimilables por ejemplo productos de recuperación de desperdicios y



extractos de levadura y minerales nutrientes. Este medio puede dejarse crecer hasta durante 3 días a 25-30°C con agitación.

5 El inóculo desarrollado así formado puede emplearse luego para inocular (en una cantidad de hasta aproximadamente 10%) un medio nutriente que contiene fuentes similares de carbono, nitrógeno y minerales asimilables. Esta fermentación se llevará a cabo deseablemente a 25-30°C durante 2 a 10 días con agitación y aireación a un pH en el intervalo de 6,0 a 7,5.

10

FORMACION DE CLAVULANATO DE LITIO Y OTROS CLAVULANATOS POR EXTRACCION DE UNA SOLUCION FENOLICA DEL ACIDO CLAVULANICO.

15 De acuerdo con una variación adicional del procedimiento, la solución acuosa que contiene clavulanato de litio puede obtenerse por extracción de una solución fenólica de ácido clavulánico con una solución acuosa de hidróxido de litio, efectuándose luego la precipitación del clavulanato de litio como se ha descrito antes, preferiblemente después de la separación del disolvente fenólico residual, extrayendo la solución acuosa con un disolvente inmiscible en agua tal como éter, cloroformo o tetracloruro de carbono.

20

25



Puede también emplearse la técnica anterior para preparar sales del ácido clavulánico distintas de la sal de litio extrayendo la solución fenólica con una vase apropiada, por ejemplo un hidróxido de metal alcalino-térreo tal como hidróxido de calcio o bario. Cualquier precipitado que se forme, por ejemplo sulfato de bario, debe separarse y la sal puede luego aislarse por ejemplo por liofilización. La purificación por conversión en la sal de litio puede efectuarse luego como se ha descrito antes.

En general, la extracción del disolvente fenólico se lleva a cabo preferiblemente de tal modo que proporcione una fase acuosa a un pH de aproximadamente 6,5.

El extracto fenólico puede producirse por extracción de un eluato acuoso de un adsorbato de carbón vegetal o resina de la clase antes descrita con un disolvente fenólico, generalmente después de concentrar el eluato, y si se desea, después de precipitar las impurezas orgánicas indeseables por adición de uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua y/o separar dichas impurezas por extracción con un disolvente inmisible en agua.

Así, por ejemplo, en este tipo de procedimiento, el eluato de bien el carbón vegetal o una resina



- 8 -

na se concentra deseablemente por evaporación a presión reducida. En general, la manipulación durante la purificación se efectúa preferiblemente a un pH en el intervalo de 6,0 a 7,0, por ejemplo a aproximadamente 6,5 para hacer mínima la descomposición. El eluato se puede purificar luego además por precipitación del material indeseable con una cetona miscible en agua tal como acetona, preferiblemente para dar una concentración de cetona de 50 a 90% en volumen, de modo ventajoso aproximadamente 85%. El pH en esta etapa es preferiblemente alrededor de 6,5 y cuando el líquido acuoso contiene ya cetona miscible en agua, ésta se separa preferiblemente con el fin de facilitar la medida del pH. El pH puede ajustarse por adición de una base, por ejemplo un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido de sodio.

La purificación adicional puede efectuarse por una etapa de extracción con disolvente, para separar los componentes indeseados, por ejemplo por concentración y ajuste del pH del filtrado desde la precipitación de cetona hasta aproximadamente 4 por adición de un ácido mineral, tal como ácido sulfúrico o clorhídrico, y extracción con n-butanol o un alcohol líquido de elevado peso molecular. Convenientemente puede emplearse 1 a 8 volúmenes de disolvente.

Después de esta extracción, la fase acuosa



sa se concentra de modo preferible aproximadamente pH 6,5 y puede purificarse todavía más por extracción del antibiótico deseado en un disolvente fenólico, por ejemplo el fenol propiamente dicho o un cresol, preferiblemente después de reducir el pH a aproximadamente 4 con ácido mineral. El disolvente fenólico contiene ventajosamente una base tal como N,N-dimetilanilina y un disolvente inmiscible en agua tal como cloroformo o tetracloruro de carbono.

10 La extracción se efectúa ventajosamente varias veces empleando aproximadamente 2/3 del volumen de disolvente para cada extracción. Los extractos pueden luego reunirse y añadirse agua, preferiblemente alrededor de 1/15 del volumen del disolvente, para formar una fase separada. El antibiótico puede luego ser sometido a retro-extracción por adición a la capa acuosa de una base, preferiblemente un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de litio o un hidróxido de metal alcalino-térreo, por ejemplo hidróxido de bario o calcio, a un pH de aproximadamente 6,5. La capa acuosa se separa de la capa fenólica y el procedimiento de retro-extracción se repite ventajosamente, reuniéndose luego los extractos acuosos. Después de la separación de cualquier precipitado, por ejemplo sulfato de bario,

25
3.2.76



puede separarse cualquier disolvente fenólico residual de la solución acuosa por extracción con un disolvente inmiscible en agua tal como éter, cloroformo y tetracloruro de carbono, y para recuperación de la sal del antibiótico la fase acuosa puede liofilizarse o deshidratarse por pulverización a pH 6,5.

Puede efectuarse una purificación adicional por técnicas convencionales tal como cromatografía, empleando en particular materiales tales como Sephadex (vendido por Pharmacia Ltd). Así, el antibiótico, que en esta etapa estará normalmente en forma de una sal, por ejemplo la sal de bario, puede aplicarse a una columna de Sephadex, por ejemplo Sephadex G 15, y eluirse con agua, reuniéndose las fracciones que contienen actividad antibiótica significativa para recuperación subsiguiente de la sal por ejemplo por liofilización.

20 CONVERSION DE CLAVULANATO DE LITIO EN ACIDO CLAVULANICO
Y OTRAS SALES

El clavulanato de litio purificado preparado por el procedimiento anterior puede convertirse en otras sales por procedimientos de intercambio iónico por ejemplo empleando una resina de intercambio iónico.

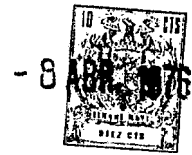


Así, por ejemplo, la sal de litio acuosa puede aplicarse a una resina de intercambio catiónico, por ejemplo Bio Rad AG 50X8; (vendida por Bio Rad Laboratories, Richmond, California) en forma de catión, siendo el catión el de la sal del ácido clavulánico que se requiere, por ejemplo sodio o potasio, seguido por elución, por ejemplo con agua.

El ácido clavulánico libre puede formarse por acidificación, por ejemplo a un pH de aproximadamente 2,6, de una solución acuosa de la sal de litio, preferiblemente de elevada fuerza iónica, por ejemplo saturada con cloruro de sodio o sulfato de amonio en presencia de un disolvente inmiscible en agua para el ácido clavulánico, por ejemplo un disolvente éster tal como acetato de etilo. Si es necesario, puede extraerse la fase acuosa con más disolvente y reunirse los extractos. En general, cualquier ácido que de un pH suficientemente bajo será adecuado para acidificación, por ejemplo un ácido mineral tal como ácido clorhídrico.

El disolvente puede separarse luego proporcionando el ácido libre, generalmente en forma de un aceite.

La solución del ácido libre en un disolvente inmiscible en agua puede emplearse para preparar una amplia gama de sales por extracción con una solución acuosa de una base apropiada y aislamiento de la



sal. Puede ser necesario filtrar el material sólido de la fase acuosa antes de proceder a aislar la sal.

5 Puesto que el ácido libre es bastante inestable, debe emplearse preferiblemente por ejemplo, para preparación de sales u otros derivados tan pronto como sea posible después de su formación.

Las preparaciones y ejemplos siguientes se dan a modo solamente de ilustración:

10 El contenido de ácido clavulánico de las aguas madres y los sólidos del procedimiento se midieron por:

1. Espectroscopía U.V.

15 Las soluciones acuosas del ácido clavulánico y sus sales muestran una absorción U.V. muy baja a aproximadamente 230 nm y por ejemplo el coeficiente de extinción molar ϵ a 280 nm es de aproximadamente 60. Sin embargo, por disolución en un álcali, se desarrolla rápidamente una absorción U.V.intensa a $\lambda_{\max}^{259} \pm 1$ y esto puede emplearse para analizar el ácido clavulánico y/o su sales. Para el análisis, los sólidos se pesaron con precisión y se disolvieron en hidróxido de sodio diluido (0,1 M) dando un volumen conocido de solución que correspondía a aproximadamente 0,01 mg/ml de ácido clavulánico. La densidad óptica de la solución a 20 25 un máximo de absorción de o alrededor de 259 nm se mi-



dió en un espectrofotómetro adecuado; las purezas de sólidos pueden calcularse suponiendo que ϵ para el ácido clavulánico es 16.700. Los coeficientes de extinción molar pueden calcularse a partir de los valores de E_1^1 , que es el coeficiente de extinción para una solución al 1% en una celdilla de 1 cm. De modo semejante, las aguas madres del procedimiento después de la separación de los disolventes orgánicos si fuera necesario, se diluyeron de modo preciso con hidróxido de sodio diluido para dar concentraciones similares de alcali y ácido clavulánico, de donde se determinó la concentración de ácido clavulánico en las aguas madres originales como se ha indicado antes. Los valores para los sólidos crudos y las aguas madres del procedimiento se corrigieron para absorción por impurezas empleando soluciones de la misma concentración en agua.

2. Actividad biológica.

Se determinó por comparación con soluciones de sólidos de contenido conocido de ácido clavulánico en ensayos en una placa acopada de agar frente al Acinetobacter sp. siguiendo esencialmente el método de Lees y Tootill (Lees, K.A. & Tootill, J.P.R., Analyst, 1955, 80 (947), 95-110; *ibid* 110-123; 80 (952), 531-535).

Todos los medios se esterilizaron con vapor antes de la fermentación. Las temperaturas son en 20°C.



Preparación 1

Preparación de sal de bario

a) Desarrollo del inóculo

Se añadió agua destilada estéril (10 ml)
5 a un cultivo en pico de flauta de agar de extracto de
malta/levadura de 14 días de Streptomyces clavuligerus
NRRL 3585 y se hizo una suspensión.

Una parte (1,5 ml) de esta suspensión se
empleó para inocular 150 ml de un medio que contenía:

	% (p/v)
10	
sacarosa	2,0
Productos de recuperación de desperdicios	1,5
Extracto de levadura	0,5
15	
K_2HPO_4	0,02
Triptona	0,5
Glicerina	1,0

y agua hasta el 100% en un matraz florentino de 2 litros.

Este matraz se incubó a 26°C durante 48 ho
20 ras a 220 revoluciones/minuto en un agitador giratorio
con una carrera de 5 cm. 150 ml de este inóculo se em-
plearon para inocular 4 litros de un medio que contenía:

	% (p/v)
25	
Harina de soja	2,1
Productos de recuperación de desperdicios	0,52



Hidrolizado de caseína	0,52
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
Almidón soluble	4,7
Glucosa	0,78

5 y agua hasta el 100% en un fermentador de 5 litros con aireación (0,75 vol/vol/min) y se mantuvo a 28°C con agitación (750 revoluciones/minuto) durante 20 horas.

b) Fermentación

10 7, 5 litros del inóculo de 20 horas de (a) se inocularon en 150 litros de un medio que contenía:

	% (p/v)
Almidón soluble	4,7
Harina de soja	2,1
15 Productos de recuperación de desperdicios	0,52
hidrolizado de caseína	0,52
Glucosa	0,78
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
20 Poliglicol (P. 2.000: Dow Chemical Co.)	0,05

y agua hasta el 100% en un recipiente de 220 litros y se fermentó durante 90 horas a 28°C con aireación (2 vol/vol/min) y agitación (350 revoluciones/minuto).

25 c) Aislamiento



El total del caldo de la etapa (b) se ajustó a pH 6,3 y se clarificó por centrifugación. El líquido sobrenadante transparente (89 l) se aplicó a una columna que contenía carbón vegetal Pittsburgh CAL (20 litros).

El carbón vegetal se lavó con agua destilada (40 litros) y luego se secó tanto como fue posible. El carbón vegetal se eluyó con acetona (10 litros) seguido por acetona acuosa al 90% (40 litros). Las fracciones de eluato (5 x 10 litros) se recogieron y cada fracción se evaporó a presión reducida para eliminar la acetona.

La fracción 1 (5 litros de solución acuosa) se concentró por liofilización hasta 2,2 litros y se añadió acetona dando una concentración final de aproximadamente 84% de acetona. A la fracción 2 (0,5 litros de solución acuosa) se añadió acetona dando una concentración final de aproximadamente 84% de acetona. Las fracciones 1 y 2 se filtraron luego cada una a través de un coadyuvante de filtración (celite 535), se evaporaron los filtrados a presión reducida para eliminar la acetona y se reunieron las soluciones acuosas resultantes.

Las soluciones acuosas de las fracciones 3 a 5 se reunieron y liofilizaron dando un sólido. La



solución acuosa de las fracciones 1 y 2 reunidas se aña
dieron luego al sólido de las fracciones 3 y 5 reunidas
dando una solución que se concentró por liofilización
hasta 0,76 litros. Esta solución (pH 4) se extrajo in-
mediatamente con butan-1-ol (1x1, 52 litros, 5x380 ml).

La fase acuosa después de la separación
del butanol por evaporación a presión reducida se lle-
vó a pH 4,2 (desde 5,6) con ácido sulfúrico y se extra-
jo con un volumen igual de fenol acuoso al 72% /N,N-di-
metilanilina/tetracloruro de carbono (53:5:15 en volu-
men). La capa de disolvente se extrajo luego con hidró-
xido de bario acuoso (500 ml) dando una solución acuo-
sa de pH 6,5. El sulfato de bario en suspensión se se-
paró por filtración y el filtrado se lavó con éter die-
tílico y se liofilizó dando 11,1 g de sal de bario só-
lida. E₁¹ 220.

Preparación 2

Preparación de sal de bario

Un caldo de fermentación obtenido por
un método similar al de la preparación 1 (a) y (b) se
purificó como sigue: El caldo de fermentación (135 li-
tros) a pH 6,25 se clarificó en una centrifugadora dan-
do un líquido sobrenadante (112 litros) a pH 6,3. Este
se hizo pasar a través de una columna de carbón vege-
tal Pittsburgh CAL (25 litros) y la columna se lavó de



modo continuo con agua (50 litros). Se vertió acetona (10 litros) suavemente en la parte superior del lecho y comenzó la elución. Esta fue seguida por acetona acuosa al 90% (60 litros). El eluato se recogió en fracciones (1x10 litros, 2x25 litros).

Cada fracción se destiló a presión reducida para separar la acetona. La solución acuosa residual se ajustó a pH 6,0 con hidróxido de sodio 1M. Las fracciones se reunieron luego y se destilaron adicionalmente hasta 2,9 litros, transfiriéndolas a un recipiente adecuado y se llevaron con las aguas de la caldera hasta 3,3 litros. La acetona (17 litros) y Celite 535 (500 g) se añadieron al concentrado con agitación vigorosa. La suspensión resultante se filtró y la torta se lavó con acetona acuosa al 85% (4 litros).

El filtrado y las aguas de lavado reunidos se destilaron a presión reducida hasta 4,0 litros. El pH se ajustó desde 5,65 hasta 6,0 con hidróxido de sodio 1M y se continuó la destilación hasta que el volumen fue 1,0 litros. El concentrado resultante se acidificó a pH 4,0 con ácido sulfúrico al 20% y se lavó con butan-1-ol (4 x 750 ml, 1x500 ml). El butan-1-ol disuelto se separó por destilación de la fase acuosa bajo vacío.

Después de ajustar a pH 4,2 con ácido



sulfúrico al 20%, se extrajo el concentrado 3 veces con una mezcla de fenol líquido de B.P. (265 ml), tetracloruro de carbono (75 ml) y N,N-dimetilanilina (25 ml). El pH se ajustó hasta 4,2 para cada extracto. Los extractos de disolvente reunidos se agitaron con agua (250 ml) y el pH se ajustó a 6,5 con hidróxido de bario acuoso saturado (70 ml). Después de la separación de las fases el disolvente se volvió a extraer con agua (200 ml) y con hidróxido de bario acuoso saturado (7 ml).

Las fases acuosas reunidas se lavaron con éter dietílico (3x200 ml), se redujeron a vacío hasta 200 ml y se liofilizaron dando 29,4 g de un sólido pardo claro. $E_1^1 = 152$.

Preparación 3

Preparación del eluato de carbón vegetal que contiene ácido clavulánico

a) Desarrollo del inóculo

Se añadió agua destilada estéril (10 ml) a un cultivo en pico de flauta de agar de extracto de malta/levadura de 14 días de Streptomyces clavuligerus NRRL 3585 y se hizo una suspensión.

Una parte (2,0 ml) de esta suspensión se empleó para inocular 150 ml de un medio que contenía:

	% (p/v)
Sacarosa	2,0



	Productos de recuperación	
	de desperdicios	1,5
	Extracto de levadura	0,5
	K_2HPO_4	0,02
5	Triptona	0,5
	Glicerina	1,0

y agua hasta 100%.

en un matraz florentino de 2 litros.

El matraz se incubó a 26°C durante 48
 10 horas en un agitador giratorio (carrera 5 cm; 220 revoluciones/minuto).

Los contenidos de seis de dichos matra-
 ces (900 ml en total) se emplearon para inocular seis
 fermentadores de 5 litros cada uno que contenían 4,5 li-
 15 tros de un medio que contenía:

		% (p/v)
	Harina de soja	2,1
	Productos de recuperación	
	de desperdicios	0,52
20	Hidrolizado de caseína	0,52
	Sulfato ferroso	
	Heptahidratado	0,01
	Almidón soluble	4,7
	Glucosa	0,78
25	Emulsión antiespumante	
	de silicona	0,05 (v/v)

3.2.76



y agua hasta 100%

Los fermentadores se airearon (0,67 vol/vol/min) y agitaron (750 revoluciones/minuto; dos paletas impulsoras de 7,5 cm de diámetro) durante 20 horas a 28°C.

5

b) Fermentación

El inóculo (25 litros) de la etapa del fermentador de 5 litros se empleó para inocular 475 litros de un medio que contenía:

10

	% (p/v)
Harina de soja	3,0
Sulfato ferroso heptahidratado	0,01
K_2HPO_4	0,01
Almidón soluble	4,7
Emulsión antiespumante de silicona	0,05 (v/v)

15

y agua hasta 100%

contenido en un fermentador de acero inoxidable de 700 litros, se agitó a 350 revoluciones/minuto (paleta impulsora de 25 cm de diámetro y cuatro tabiques deflectores de 7,5 cm) y se aireó a 0,56 vol/vol/min. La fermentación se llevó a cabo a 28°C durante 92 horas y se añadió más antiespumante cuando fue necesario. La fermentación se mantuvo a pH 6,5.

20

25

c) Aislamiento



El total del caldo de la etapa (b) se ajustó a pH 5,45 con ácido sulfúrico fuerte y se filtró en un filtro de tambor rotatorio con una capa previa de celulosa. El filtrado (430 litros) que contenía el antibiótico se adsorbió sobre carbón vegetal (Pittsburgh CAL; 135 litros) en columnas. El carbón vegetal se lavó con agua (90 litros) para desplazar el caldo filtrado, y el antibiótico se eluyó con acetona acuosa (60% vol/vol; 180 litros)

10 Ejemplo 1

(i) Preparación de sal de calcio

(a) La sal de bario cruda de la Preparación 2 (8,83 g) se añadió a 50 ml de una solución acuosa saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se añadió acetato de etilo (50 ml) y la mezcla se agitó. Se insertó un medidor de pH en la mezcla y el pH se ajustó desde pH 6,8 hasta pH 2,6 con aproximadamente 15 ml de H_2SO_4 1M. La solución acuosa se separó del acetato de etilo y se agitó de nuevo con una porción de reciente aportación de acetato de etilo (50 ml). Los dos extractos de acetato de etilo se reunieron, se añadió agua destilada (100 ml) y la mezcla se agitó en presencia del medidor de pH. Se añadieron aproximadamente 40 ml de una solución saturada de hidróxido de calcio para llevar el pH de la mezcla a 6,6. La solución acuosa se separó del acetato de eti-



lo, se filtró a través de un coadyuvante de filtración y se liofilizó dando 1,44 g de la sal de calcio sólida.

(b) El sólido de (a) se disolvió en 15 ml de agua destilada, se filtró a través de un filtro Millipore y se aplicó a una columna que contenía Sephadex G 15, rellena con agua dando un lecho 152 cm de altura y 2,5 cm de diámetro. La elución se hizo con agua destilada y se recogieron fracciones de 20 ml. Las fracciones se ensayaron después de CCD (celulosa, placas de Eastman-Kodak 6065; disolvente, acetonitrilo-agua, 7:3 en volumen) por recubrimiento con agar nutritivo que contenía Staphilococcus aureus. Se reunieron las fracciones 33-37 y se liofilizaron dando 490 mg. El sólido se mantuvo sobre P₂O₅ a vacío durante 60 horas. La sal de calcio de (b) tenía las características siguientes:

pKa

Se encontró por valoración potenciométrica de la sal que el valor de pKa del ácido correspondiente era aproximadamente 2,4.

Rotación óptica

$[\alpha]_D$ a 22°C, + 44,92 (concentración, 0,287 g/100 ml de agua).

Espectro U.V.

Una muestra (0,00148 g) que había sido



disuelta en 100 ml de NaOH 0,1 M mostró un máximo de absorción (λ_{max}) a 258 nm con un valor de E_1^1 de aproximadamente 550.

Espectro IR

5 El espectro infrarrojo de una masa con Nujol de la muestra presentó máxima absorción en números de onda (cm^{-1}).

	3300 f, a	2330 d	1788 f	1692 m
	1604 f	1404 f	1305 f	1190 m
10	1118 m	1082 m	1060 m	1042 m
	1012 m	992 m	968 m	892 m
	848 d	790 d	740 m	654 a

(f, m, a y d = intensidad fuerte, media, amplia y débil respectivamente).

15 El espectro completo se muestra en la Figura 3 de los dibujos que se acompañan.

Espectro de R.M.N.

20 El espectro de R.M.N. protónica de una solución de la muestra en agua pesada presentó grupos de picos (valores τ) centrados en aproximadamente 4,31, 5,10, 5,85, 6,46, 6,91.

Cromatografía en capa delgada (C.C.D)

25 Porciones de la muestra, disuelta en agua, se aplicaron al origen de las placas de celulosa para capa delgada (CD) de Eastman-Kodak (plástico-res-



- 8 -

paldado, EK 6065) o placas de sílice para CD de Eastman-Kodak (plástico-respaldado, EK 6060). Las placas se desarrollaron con disolvente a la temperatura ambiente y luego se secaron al aire y se recubrieron con agar nutriente que contenía Staphylococcus aureus. Los valores de Rf, calculados como la distancia desde el origen al centro de cada zona de desarrollo bacteriano inhibido dividida por la distancia desde el origen al frente del disolvente, se dan a continuación para cinco sistemas.

<u>Disolvente</u>	<u>Soporte</u>	<u>Rf</u>
Propan-1-ol:agua (7:3)	Celulosa	0,60
Butan-1-ol: ácido acético:agua (3:1:1)	"	0,64
Acetonitrilo:agua(7:3)	"	0,68
15 Acetonitrilo:agua:propan-2-ol (1:1:1)	"	0,87
Butanol-1-ol:ácido acético:agua (3:1:1)	sílice	0,63

Ionoforesis en papel

Porciones de la muestra se sometieron a ionoforesis sobre papel Whatman 541 durante 1 hora con 400 V aplicados sobre 20 cm. La actividad, detectada por recubrimiento del papel secado al aire con agar nutriente que contenía Staphylococcus aureus, tenía una movilidad, con respecto a la cianocobalamina, de 4,5 cm hacia el ánodo a pH 4,8 (acetato 0,01 M), pH 6,9 (fosfato 0,01 M) y pH 9,5 (pirofosfato 0,01 M).



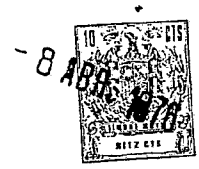
(ii) Preparación de la sal de litio

5 La sal de calcio (1 g; E₁¹ 590, pura por análisis U.V.) preparada como en (i) (b) anterior se disolvió en 10 ml de agua y se añadió 10 ml de una
10 solución saturada de cloruro de litio en agua. La cristalización ocurrió sin rascada ni siembra. Después de enfriar a 0°C se filtraron los cristales, se lavaron con 5 ml de etanol, 5 ml de acetona y 2x5 ml de éter dietílico. Los cristales se secaron a presión reducida (0,1 mm de Hg) sobre gel de sílice durante 2 horas dando 495,5 mg de sal de litio sólida. Esta sal tenía las características siguientes:

Análisis elemental

15 Encontrado (los valores medios se dan entre paréntesis):
C, 45,5, 45,8 (45,65); H, 3,8, 3,8 (3,8); N, 7,0, 7,2(7,1);
Li, 3,2%. No se detectó azufre por un método dado por N.D. Cheronis & J.B. Entrikin (1947) en Semimicro Qualitative Analysis, p. 93 Crowell, New York.
20 C₈H₈NO₅Li.1/4H₂O requiere C, 45,84; H, 4,06; N, 6,68; Li, 3,31%.

25 Los valores del análisis de Li antes citados, (3,2%) se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica. La ceniza sulfatada era de 26,8%, que calculada en forma de Li₂SO₄ es equivalente a 3,38% de



litio.

pKa

5 Se encontró por valoración potenciométrica de la sal que el valor de pKa del ácido correspondiente era aproximadamente 2,3.

Rotación óptica

El valor $[\alpha]_D^{25}$ para una solución acuosa al 0,145% p/v a 24°C era de +66,02.

Espectro ultravioleta

10 El espectro de absorción u.v. de una solución al 0,00091% en hidróxido de sodio 0,1 M tenía un máximo de absorción (λ_{max}) a 258 nm con un valor E_1^1 de 788.

Espectro infrarrojo

15 El espectro i.r. de una masa con Nujol presentó picos de absorción (cm^{-1}) a aproximadamente:

	3.420 (m)	1402 (f)	1200 (d)	1026 (m)	880 (d)
	3012 (d)	1338 (m)	1129 (m)	992 (m)	850 (d)
	1765 (f)	1325 (f)	1101 (m)	976 (m)	734 (m)
20	1683 (f)	1300 (m)	1062 (m)	950 (f)	708 (d)
	1618 (f)	1224 (d)	1048 (f)	900 (m)	

El espectro completo se muestra en la Figura 1 de los dibujos que se acompañan.

Espectro de R.M.N.

25 Un espectro de r.m.n. protónica de 100



MHz de la sal de litio en solución de agua pesada mostró picos (valores de τ con multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) entre paréntesis) centrados aproximadamente en 4,26 (d,3), 5,05 (t,8), 5,06 (s), 5,81 (d,8), 6,43 (dd, 3 y 17) y 6,89 (d,17) (s, d, dd, t y m = singlete, doblete, doblete-doblete, triplete y multiplete respectivamente).

Ejemplo 2

Recristalización de la sal de litio.

10 La sal de litio (0,1 g) preparada en el Ejemplo 1 (ii) se disolvió en agua (1,0 ml) y se diluyó cuidadosamente en isopropanol (19 ml). El producto cristalizó lentamente a 0°C y se recogió en dos cosechas con centrandose por ebullición a presión reducida hasta 5 ml para la segunda cosecha. Los cristales de sal de litio se secaron sobre gel de sílice a vacío durante 3 días.

15 Cosecha 1 20,0 mg, λ_{\max} 259 nm. $E_1^1 = 814$ en solución de hidróxido de sodio (0,1 M) a 10 $\mu\text{g/ml}$.

Análisis elemental Encontrado: C = 46,2, 46,0; H = 4,10, 3,85; N = 6,8, 6,7%. $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_5\text{Li} \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$ requiere C = 45,84; H = 4,06; N = 6,68%.

20 Cosecha 2 67,0 mg. λ_{\max} 259 nm. $E_1^1 = 800$ en hidróxido de sodio (0, 1N) at 10 $\mu\text{g/ml}$. Análisis elemental encontrado C = 46,15, 46,5; H = 3,9, 4,0; N = 6,65, 6,5 litio 3,4%
25 (ceniza sulfatada). $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_5\text{Li} \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$ requiere:



C = 45,84; H = 4,06; N = 6,68; Li = 3,31%.

Ejemplo 3

5 La sal de bario (30 g; E_1^1 274 preparada como en la Preparación 2 se disolvió en agua (40 ml) y se añadió solución saturada de sulfato de amonio (300 ml). El pH de la solución se ajustó a 2,3 con ácido sulfúrico (20%, 23,0 ml) y se extrajo luego con acetato de etilo (2 x 300 ml). Se añadió agua (200 ml) a los extractos reunidos. La mezcla se agitó vigorosamente y se añadió solución de hidróxido de sodio (1M; 89,3 ml) hasta que el pH alcanzó 6,8. La fase acuosa se separó y se destiló a presión reducida hasta 33 ml. Se añadió butan-1-ol (770 ml) al concentrado acuoso y luego se mezcló, se calentó a 40°C y se agitó vigorosamente. Se separó por filtración el material insoluble y se volvió a extraer con agua: butan-1-ol (1:23 v/v) hasta que se disolvió todo. Las soluciones reunidas se enfriaron a 4°C durante toda una noche. El sólido cristalino formado se recogió por filtración, se lavó con butan-1-ol y acetona y se secó al aire dando 3,34 g de sal de sodio (E_1^1 648).

10

15

20

2,92 g de esta sal de sodio se disolvieron en agua (20 ml) y se filtró. El filtrado se agitó a 0°C mientras se introducía solución de cloruro de litio (20 ml, saturada a 20°C) durante 5 minutos. Se con-

25



tinuaron la agitación y el enfriamiento durante 1 hora después de la cual se recogieron los cristales por filtración, se lavaron con etanol (20 ml), acetona (2 x 20 ml), éter dietílico (2 x 25 ml) y se secaron al aire dando la sal de litio (2,275 g) en forma de prisma planos alargados y blancos. (E_1^1 770).

Ejemplo 4

La sal de bario cruda (7,99 g; E_1^1 288) preparada como se ha descrito en la Preparación 2 se disolvió en agua (60 ml) y se filtró. El filtrado se trató en porciones con sulfato de litio (4,0 g) con agitación a temperatura ambiente hasta que no dió ensayo de bario sobre una placa de manchas externas con rodionato de sodio. La suspensión se clarificó por centrifugación y el líquido sobrenadante se decantó y concentró por ebullición hasta aproximadamente 35 ml a presión reducida. El cloruro de litio (9,0 g) se añadió en porciones, con agitación y enfriamiento; después de 1 hora a 20°C la sal de litio se recogió por filtración, se lavó con etanol (10 ml), acetona (2 x 25 ml), éter dietílico (2 x 20 ml) y se secó al aire en embudo de filtro dando 1,590 g de prismas blancos (E_1^1 790).

Ejemplo 5

Preparación de la sal de sodio

La sal de litio preparada como en el



Ejemplo 1(ii) (3,5 g) se disolvió en 20 ml de agua des-
tilada y se aplicó a una columna que contenía 50 ml de
resina de intercambio catiónico AG 50x8 (Bio-Rad, Na⁺;
tamaño de malla 200-400). La elución se hizo con agua
5 y se recogieron fracciones de 8 ml. Las fracciones se
ensayaron, después de la aplicación de porciones a pa-
pel, por recubrimiento con agar nutriente que contenía
Staphylococcus aureus. Se reunieron las fracciones acti-
vas (4 a 13) y se liofilizaron.

10 El sólido liofilizado se disolvió en agua
destilada dando 19 ml de solución, se agitó con butan-
1-ol (450 ml) y se calentó (baño de agua) hasta que la
solución era casi transparente. La solución caliente se
filtró a través de vidrio sinterizado para separar el
15 sólido amarillo y el filtrado se mantuvo a 40°C durante
60 horas. Los cristales que se formaron se filtraron,
lavarón con butan-1-ol (2x10 ml) y luego con acetona
(2x10 ml) y se secaron a presión reducida a 40°C duran-
te 1 hora dando 2,18 g de sólido. El sólido se recrís-
20 talizó en agua:butan-1-ol (1:23,3 en volumen) como se
ha descrito. Los cristales se secaron a presión redu-
cida sobre gel de sílice a 44°C durante 1,5 horas dan-
do 1,8 g de sal de sodio sólida.

25 El sólido era higroscópico. Se trituró
en un triturador y mortero y se dejó que absorbiera el



agua atmosférica a 18°C. Después de haber absorbido aproximadamente 22% (p/p) de agua, se alcanzó el equilibrio.

5 Esta sal tenía las características siguientes:

Análisis elemental (del sólido húmedo equilibrado)

Encontrado (los valores medios se dan entre paréntesis):

10 C, 33,3, 33,2 (33,25); H, 4,6, 4,6 (4,6); N, 4,6, 4,7 (4,65); Na, 7,3 (por espectrofotometría de absorción), 7,9 (calculado a partir de cenizas sulfatadas); agua, 21,95%

$C_8H_8O_5N Na \cdot 4H_2O$ requiere C, 32,76; H, 5,46; N, 4,73; Na, 7,8; agua, 24, 57%.

15 Análisis metálico

(1) Encontrado por espectrofotometría de absorción atómica:

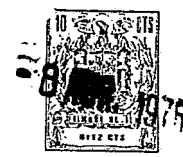
Na 7,3 \pm 0,2% (Este valor se cita en el análisis elemental)

20 (2) Suponiendo que la ceniza sulfatada es Na_2SO_4 , el contenido de Na se calculó como 7,9%

Rotación óptica

El valor de $[\alpha]_D^{25}$ para una solución acuosa al 0,134% (p/v) a 24°C fue + 47°.

25 Espectro ultravioleta



El espectro de absorción U.V. de una solución al 0,0098% en NaOH 0,1M tenía un máximo de absorción (λ_{max}) a 258 nm con un valor E_1^1 de 555.

Espectro infrarrojo

5 El espectro IR de una mesa con Nujol presentó picos de absorción (cm^{-1}) a aproximadamente

3400 f	1592 f	1288 m	1080 d	986 f	850 d
3300 f	1396 f	1206 d	1060 m	967 m	802 d
1792 f	1348 m	1190 m	1048 m	945 d	753 m
10	1690 f	1310 f	1138 m	1015 f	902 m
	1665 m	1302 c	1120 m	998 m	880 d

El espectro completo se muestra en la Figura 2 de los dibujos que se acompañan.

Espectro de R.M.N.

15 El espectro de r.m.n. protónica de una solución en agua pesada mostró grupos de picos (valores de τ) centrados a aproximadamente 4,28, 5,07, 5,82, 6,44 y 6,88.

Ejemplo 6

20 Preparación de la sal de potasio

La sal de litio (3,0 g) preparada como en el Ejemplo 1 (ii) se disolvió en agua (100 ml) y se hizo pasar a través de una columna Dower 50W x 2 (450 ml, ciclo de potasio). Se descartó la fracción de cabeza (150 ml). Los siguientes 400 ml de eluyente se recogie-

25



ron y evaporaron hasta 15 ml a presión reducida. Se aña
dió butan-1-ol (340 ml) y la mezcla se calentó y agitó
bien. Se separó por filtración algo de sólido insoluble.
El filtrado se destiló a presión reducida hasta 200 ml
5 y luego se almacenó a 4°C durante toda una noche. El de
pósito cristalino se filtró, se lavó con butan-1-ol (2 x
10 ml), acetona (2 x 50 ml) y éter dietílico (2 x 50 ml)
y finalmente se secó en un desecador a vacío a temperatu
ra ambiente. Rendimiento 2,34 g de sal de potasio ($E_1^1 =$
704). El E_1^1 se determinó disolviendo 7,1 mg de sal de
potasio en 100 ml de agua. Esta solución se diluyó 1 a
10 con hidróxido de sodio 0,1 M dando una solución final
de 7,1 $\mu\text{g/ml}$.

Análisis elemental

15 Encontrado: (los valores medios se dan
entre paréntesis): C, 40,0, 40,14 (40,07); H, 3,5, 355
(3,53); N, 6,0, 5,82 (5,91); K (por espectrofotometría
de absorción) 16,0, (per ceniza sulfatada) 15,9; agua,
1,75, 1,95 (1,85)%. $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_5\text{K} \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$ requiere C, 39,7;
20 H, 3,5; N, 5,8; K, 16,2, agua 1,96%.

Rotación óptica

El valor de $[\alpha]_D^{23}$ para una solución
acuosa al 0,276% p/v fue + 58,4°.

Las sales de calcio, bario y magnesio del
25 ácido clavulánico se prepararon a partir de clavulanato

requiere C, 44,4; H, 5,6, N, 13,0%. Se encontraron tra-
zas de agua (0,6%) por el análisis de Karl Fischer.

Ejemplo 9

Preparación de la sal de metilamina

5 Una columna (200 ml) de Amberlite IR
120 H⁺ se convirtió en forma de metilamonio por trata-
miento con solución de metilamina 0,5 M en agua. Esta
se lavó hasta neutralidad con agua y cloruro de metila-
monio (3,0 g) y se introdujo en agua (10 ml). La colum-
10 na se lavó hasta que estuvo libre de cloruro con agua
y estaba lista para empleo.

La sal de litio (1,50 g) se disolvió en
agua (15 ml) y se introdujo en la parte superior de la
columna. La columna se desarrolló en agua y se recogie-
15 ron las fracciones (25 ml).

Se reunieron las fracciones 3-7 (161 ml
con aguas de lavado), se destilaron a 352/1,0 mm hasta
aproximadamente 2 ml y se añadió n-butanol (200 ml). La
solución transparente se destiló en condiciones simila-
20 res hasta 20 ml cuando tuvo lugar la cristalización.
Los cristales se recogieron por filtración después de
1 hora a 22, se lavaron con éter dietílico (2 x 15 ml)
y se secaron durante 3 horas a 1 mm dando la sal de me-
tilamina (1,2 g) en forma de racimos de prismas alarga-
25 dos blancos. \bar{n}_D^{23} (c 0,23% en agua) + 56,12, λ_{\max} (\bar{n}_D



dróxido de sodio 0,1 N, 9,5 $\mu\text{g/ml}$) 260 nm ($E_1^{1\text{cm}}$ 584); los picos de i.r. en Nujol incluyen 2500, 1790, 1692, 1632 y 1576 cm^{-1} ; los valores de τ (8% D_2O) incluyen 6,40 y 6,86 (dd, 17Hz, 3Hz: d, 17Hz) 4,24 (d, 3Hz), 5,06 (t, 7Hz), 5,78 (d, 7Hz), 5,08 (s), 7,42 (s). Encontrado C, 46,7; H, 6,1; N, 12,5%. $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ requiere C, 47,0; H, 6,1 y N, 12,2%.

Ejemplo 10

Preparación de la sal de piperidina

10 Una columna de resina de intercambio iónico (200 ml, Laboratorios Bio-Rad, AG(R) 50W x 2, 100-200 mallas forma H^+) se convirtió en forma de piperidinio con una solución de piperidina (75 ml) en agua (1500 ml). La resina se lavó hasta neutralidad con agua y se trató con cloruro de piperidinio (3 g) en agua (10 ml). La columna se lavó hasta que estuvo libre de cloruro con agua y estaba lista para empleo.

15 La sal de litio (1,50 g) se introdujo en la parte superior de la columna en agua (15 ml) y la columna se desarrolló con agua tomando las fracciones de 25 ml. Se reunieron las fracciones 3-6 con las aguas de lavado (172 ml).

20 La solución se evaporó hasta próxima a la sequedad a $35^\circ/1,0$ mm y se añadió tolueno puro. La suspensión aceitosa se evaporó hasta sequedad a presión re

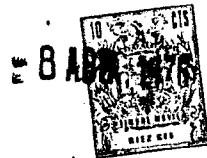


ducida como se ha dicho antes y el sólido cristalino así obtenido se trituró con acetato de etilo (90 ml). La sal de piperidinio cristalina se recogió por filtración, se lavó con acetato de etilo (3 x 30 ml) y el disolvente residual se separó a 0,1 mm de Hg durante 3 horas proporcionando 1,775 g de prismas ligeramente blancuzcos. $[\alpha]_D^{24}$ (c 0,35% en agua) + 42,2°; λ_{max} (hidróxido de sodio 0,1N, 10 μ g/ml) 259,5 nm (E_1^1 474); picos i.r. en Nujol incluyen 3380, 2540, 1782, 1682 y 1608 cm^{-1} ; los valores de τ (8% D_2O) incluyen 6,90 (d, 17Hz), 6,44 (dd3, 17Hz), 4,28 (d, 3Hz), 5,08 (s), 5,84 (d, 8Hz), 5,08 (t, 7Hz), 6,84 (multiplete complejo), 8,0-8,5 (multiplete complejo). Encontrado C, 52,8; H, 7,2; N, 9,3%. $C_{13}H_{20}N_2O_5 \cdot 0,6 H_2O$ requiere C, 52,9; H, 7,4; y N, 9,5%.

Ejemplo 11

Preparación de la sal de trietilamina

Una columna de resina de intercambio iónico (Bio-Rad AG (R) 50 W como se ha descrito en el Ejemplo 10) se convirtió en la forma de trietilamonio con una solución de trietilamina en agua (0,5 N, 1,5 litros) y se lavó hasta neutralidad con agua. Se introdujo una solución de cloruro de trietilamonio (3 g) en agua (15 ml) a la columna, la columna se lavó hasta que estuvo libre de cloruro con agua y estaba ya lista para empleo.



5 La sal de litio (1,5 g) se introdujo por la parte superior de la columna en agua (15 ml) y la columna se desarrolló con agua tomando fracciones de 25 ml. Se reunieron las fracciones 4-9 (175 ml con las aguas de lavado).

10 La solución se concentró por ebullición a presión reducida (350/1,0 mm) dando un aceite que se concentró por ebullición tres veces con tolueno en las mismas condiciones. Los cristales resultantes se rompieron en acetato de etilo (50 ml), se recogieron por filtración, se lavaron dos veces con éter dietílico (2 x 20 ml) y se libraron del disolvente residual en un desecador durante 3 horas a 0,1 mm dando la sal de trietilamonio (1,588 g) en forma de prismas ligeramente
15 blancuzcos. α_D^{25} (c 0,22% en agua) + 44,30; λ_{\max} (hidróxido de sodio 0,1N, 9,7 $\mu\text{g/ml}$) 258 nm (E_1^1 485); picos i.r. en Nujol incluyen 3250, 2080, 1784, 1700 y 1640 cm^{-1} ; los valores de τ (10% D_2O) incluyen 6,41 y 6,87 (dd 17Hz, 3Hz: d 17Hz), 4,26 (d, 3Hz), 5,07 (t, 7Hz), 5,78 (d, 7Hz), 5,07 (s), 8,74 (t, 7Hz) y 6,78 (9, 7Hz). Encontrado C, 55,2; H, 7,9; N, 9,2%, $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$ requiere C 55,2; H, 8,0 y N, 9,2%.

Ejemplo 12

25 Una muestra de eluato de carbón vegetal preparado como en la Preparación 3 se concentró a pre-



5 sión reducida para separar la acetona. El concentrado resultante (1 litro; que contenía 1,28 g de ácido clavulánico por bioensayo) se aplicó a una columna de resina IRA68 (ciclo de cloruro; 100 ml). La columna se lavó con agua (300 ml) y se eluyó con solución acuosa de cloruro de litio al 5% (p/v), recogién dose el eluato en fracciones de 100 ml.

10 Se recogieron las fracciones 1 y 2 (200 ml), se evaporaron a presión reducida hasta 40 ml y se dejaron a 42C toda una noche. Los cristales formados se filtraron, se lavaron sucesivamente con etanol (10 ml), acetona (50 ml) y éter dietílico (50 ml) antes de secar a vacío dando 530 mg de sólido blanco (E_1^1 802) representando un rendimiento del 40,8% del eluato de carbón vegetal. La adición de un volumen igual de cloruro de litio acuoso saturado a las aguas madres seguido por almacenamiento a 42C dió una segunda cosecha, que se trató como antes, de 178 mg (E_1^1 740) representando un rendimiento adicional de 12,7%.

15

20 En una serie de experimentos similares se variaron la concentración del eluyente de cloruro de litio, la resina de intercambio iónico y la naturaleza del catión eluyente y el anión contrario, dando los resultados que se recogen en la tabla.

25

3.2.76



	Resina	Ciclo	Eluyente (molaridad)	E ₁ E ₁	Rendimiento del Producto
5	Amberlite IRA 68	Cloruro	Cloruro de litio (0,5M)	750	51,8
	Amberlite IRA 68	Cloruro	Cloruro de litio (0,25M)	760	55,6
10	Amberlite IRA 93	Cloruro	Cloruro de litio (1,0M)	560	50,3
	Amberlite IRA 93	Cloruro	Cloruro de litio (0,5M)	640	44,5
15	Amberlyst A 21	Cloruro	Cloruro de litio (1,0M)	630	54,3
	Amberlite IRA 68	Acetato	Acetato de litio (0,5M)	660	56,8
20	Amberlite IRA 68	Formiato	Formiato de amonio (0,5M)	520	55,8

25

* Rendimiento del producto basado en el elua-



to de carbón vegetal de entrada.

Ø En estos experimentos se preparó la sal de litio por concentración de los eluatos x 6 y adición de un volumen igual de solución de cloruro de litio al 50% (p/v).

5 Las sales de litio resultantes se trataron como antes.

Ejemplo 13

Una muestra (4 litros) de eluato de carbón vegetal preparada como en la Preparación 3 se hizo pasar a través de una columna de IRA68 (ciclo de cloruro; 250 ml) que se lavó luego con agua (250 ml) y se eluyó con solución de cloruro de litio al 5% (p/v). Se recogieron 200 ml del eluato que contenían 73% de la actividad biológica de entrada. Una muestra (70 ml) de este eluato se trató con 5 volúmenes de propan-2-ol con agitación, dando un precipitado alquitranoso. El líquido sobrenadante se decantó y concentró a presión reducida hasta 7 ml. Después de permanecer a 40°C durante toda la noche el producto cristalino se filtró, se lavó sucesivamente con etanol, acetona y éter dietílico antes de secar a vacío. El sólido seco (870 mg) se estimó que era puro por ensayo biológico y representó un rendimiento del 94% del eluato de la columna de resina.

10

15

20

Ejemplo 14

Una columna de resina IRA68 (ciclo de cloruro; 50 ml) se cargó con eluato de carbón vegetal (840 ml)

25



5 preparado como en la Preparación 3, se lavó con agua (100 ml) y se eluyó con cloruro de litio al 5% (p/v) en propan-2-ol:agua (5:1). Los primeros 5 volúmenes de lecho se concentraron a presión reducida y el antibiótico se cristalizó como en el Ejemplo 13. El sólido pesaba 292 mg (Bioensayo: 970 mg de clavulanato de litio/mg de sólido) y representaba un rendimiento del 45% del eluato de carbón vegetal.

Ejemplo 15

10 El caldo se fermentó y se filtró como en la Preparación 3 y una muestra del caldo filtrado (1 litro) que contenía 0,43 g de ácido clavulánico (ensayo biológico) se hizo pasar a través de una columna de resina IRA93 (ciclo de cloruro; 100 ml). La columna se lavó con ácido acético diluido (0,25 M; 200 ml), agua (750 ml) y se eluyó con solución de cloruro de litio acuosa (1 M). Los primeros 150 ml de eluato, que contenían 0,28 g de ácido clavulánico (ensayo biológico) se concentraron a presión reducida hasta 15 ml y se almacenaron a 4°C durante toda una noche. El producto se filtró, se lavó sucesivamente con etanol, acetona y éter dietílico antes de secar el aire dando 668 mg de sólido (E_1^1 245) representando un rendimiento del caldo filtrado de 47%.

25 Ejemplo 16



El caldo se fermentó y filtró como en la Preparación 3 y una muestra del caldo filtrado (2 litros) que contenía 1,23 g de ácido clavulánico (ensayo biológico) se hizo pasar a través de una columna de resina IRA93 (ciclo de cloruro: 240 ml). La columna se lavó con agua (500 ml), propan-2-ol:agua (5:1; 400 ml) y luego se eluyó con cloruro de litio al 5% (p/v) en propan-2-ol:agua (5:1). Los primeros 970 ml del eluato se concentraron a presión reducida hasta 100 ml y se almacenaron a 4°C durante 2 días. El producto se filtró y lavó como en el Ejemplo 15 dando 286 mg de sólidos (E_1^1 662) representando un rendimiento del caldo filtrado de 19%.

Ejemplo 17

El caldo se fermentó y filtró como en la Preparación 3. Se cargaron 500 ml del filtrado en una resina IRA93 (ciclo de cloruro; 50 ml). La columna se lavó con agua (50 ml) y etanol acuoso al 95% (100 ml), antes de eluir con cloruro de litio (1% p/v en etanol acuoso al 95%; fracciones de 50 ml). Se reunieron las fracciones 2 y 3 y se evaporaron a presión reducida hasta que comenzó a cristalizar un material sólido. El concentrado se enfrió a + 4°C durante 3/4 horas y el sólido se recogió sobre un filtro sinterizado. El sólido se lavó con etanol, acetona y éter dietílico y se secó durante



1/2 horas a temperatura ambiente en una estufa a vacío dando 89 mg de clavulanato de litio (E_1^1 770), representando un rendimiento del 32% en el caldo filtrado.

Ejemplo 18

5 El eluato de carbón vegetal preparado como en la Preparación 3 (5 litros) se hizo pasar a través de una columna de IRA68 (500 ml de volumen de lecho) en el ciclo de cloruro a 1 litro/hora. La columna se lavó con agua (1 litro) y se eluyó con solución
10 de cloruro de sodio 0,5 M. El primer litro del eluato se concentró por evaporación rotatoria hasta 90 ml. Una parte del concentrado (10 ml) se trató con prepan-2-ol (50 ml) con agitación. El líquido sobrenadante se
15 concentró por evaporación rotatoria hasta un volumen de 3 ml y se trató con 3 ml de solución de cloruro de litio al 30% p/v. Después de permanecer a 40C durante toda una noche el producto se filtró, se lavó sucesivamente con etanol, acetona y éter dietílico y se secó
20 dando un polvo blanco, 280 mg, con E_1^1 770.

Ejemplo 19

25 El clavulanato de litio (E_1^1 667; 2,0 g preparado como en el Ejemplo 15 con tratamiento subsiguiente con alcohol isopropílico) se disolvió en agua (16 ml) y se filtró; se añadió cuidadosamente etanol



(64 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado formado inicialmente no contenía clavulanato de litio como se determinó por espectroscopía u.v. y se desechó. El líquido sobrenadante se diluyó con solución saturada de cloruro de litio (16 ml) y se puso aparte para cristalizar durante 2 1/2 horas. Los cristales se recogieron por filtración, se secaron con succión, se lavaron con acetona (2 x 15 ml), éter dietílico (2 x 20 ml) y se secaron a vacío hasta peso constante (1,350 g) ($E_1^1 = 735$).

Ejemplo farmacéutico 1

Se disuelve clavulanato de litio (100 mg) en solución salina fisiológica (10 ml) y se mezcla exhaustivamente con una solución de cefaloridina (100 mg) en solución salina fisiológica (10 ml) dando una solución adecuada para inyección.

Ejemplo farmacéutico 2

Se preparó una composición similar a la del Ejemplo farmacéutico 1 pero el clavulanato de litio se reemplazó por clavulanato de sodio (100 mg).

Ejemplo farmacéutico 3

Se disuelve clavulanato de litio (100 mg) en solución salina fisiológica (10 ml) y se mezcla exhaustivamente con una solución de ampicilina (100 mg) en solución salina fisiológica (10 ml) dando una solución ade-



cuada para inyección.

5

REIVINDICACIONES

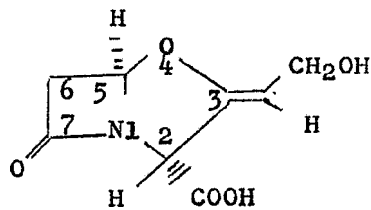
10

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

15

1ª.- Un procedimiento para la separación de impurezas contaminantes del ácido clavulánico de fórmula I.

20



I

25

3.2.76



5 y/o una sal del mismo con lo que dicho ácido y/o dicha sal se hace reaccionar con un compuesto de litio iónico y acuoso, proporcionando una solución acuosa que contiene clavulanato de litio que es precipitado luego a partir de esta solución y el precipitado se separa de dicha solución acuosa.

10 2a.- Un procedimiento según la reivindicación 1a, en el que la precipitación de clavulanato de litio se efectúa por inclusión en dicha solución acuosa que contiene clavulanato de litio de una concentración suficiente de una sal de litio soluble en agua para separar por salificación dicho clavulanato.

15 3a.- Un procedimiento según la reivindicación 2a, en el que dicho compuesto de litio iónico es idéntico a dicha sal de litio soluble en agua.

20 4a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1a-3a, en el que el compuesto de litio iónico y/o la sal de litio soluble en agua es cloruro de litio.

25 5a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1a-3a, en el que el compuesto de litio iónico y/o la sal de litio soluble en agua es bromuro, yoduro o sulfato de litio o un carboxilato de litio.

6a.- Un procedimiento según la reivindi



cación 5^a, en el que dicho carboxilato es acetato, propionato, formiato, benzoato o lactato de litio.

5 7^a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que antes de la precipitación la concentración del clavulanato de litio en dicha solución acuosa es al menos 0,1% en peso.

10 8^a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2^a-7^a, en el que la concentración molar de dicha sal de litio soluble en agua está en el intervalo de 4M 10M.

 9^a.- Un procedimiento según la reivindicación 8^a, en el que dicha concentración molar está en el intervalo de 5M a 8M.

15 10^a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1^a-3^a, en el que la sal del ácido clavulánico que reacciona inicialmente es una sal de metal alcalino o metal alcalino-térreo.

20 11^a.- Un procedimiento según la reivindicación 10^a, en el que dicha sal de ácido clavulánico es la sal de calcio.

 12^a.- Un procedimiento según la reivindicación 10^a, en el que dicha sal de ácido clavulánico es la sal de bario.

25 13^a.- Un procedimiento según cualquiera



de las reivindicaciones 1a-9a, en el que la sal del ácido clavulánico que reacciona inicialmente es la sal de sodio, potasio o magnesio o una sal formada con una resina básica de intercambio iónico.

5 14a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1a-3a, en el que una sal del ácido clavulánico distinta de la sal de litio se disuelve en solución acuosa con inclusión de una cantidad suficiente de una sal de litio soluble en
10 agua para separar por salificación el clavulanato de litio.

15 15a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-9a, en el que la sal del ácido clavulánico que reacciona inicialmente es una sal formada con una resina básica de intercambio iónico y la sal de resina se pone en contacto con dicho compuesto de litio iónico acuoso proporcionando un eluato acuoso que contiene clavulanato de litio que se separa de la resina residual.

20 16a.- Un procedimiento según la reivindicación 15a, en el que se concentra dicho eluato que contiene clavulanato de litio, y que contiene también compuesto de litio iónico en exceso, con lo cual la concentración del compuesto de litio iónico es suficiente para
25 separar por salificación el clavulanato de litio.



5 17a.- Un procedimiento según la reivindicación 15a ó 16a, en el que se añade un disolvente orgánico miscible en agua al eluato para precipitar impurezas, que precipitan se separa antes de la precipitación de clavulanato de litio.

10 18a.- Un procedimiento según la reivindicación 15a, en el que el compuesto de litio iónico acuoso empleado como eluyente contiene un disolvente orgánico miscible en agua con lo cual se suprime la elución de las impurezas desde la resina.

15 19a.- Un procedimiento según la reivindicación 1a, en el que la precipitación del clavulanato de litio de una solución acuosa del mismo se origina por la presencia en dicha solución de una concentración elevada de un disolvente miscible en agua.

20 20a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17a a 19a, en el que el disolvente orgánico miscible en agua es un alcohol una cetona o un éter o un disolvente de amida sustituida, imida o sulfóxido.

21a.- Un procedimiento según la reivindicación 20a, en el que dicho disolvente es isopropanol o etanol.

25 22a.- Un procedimiento según la reivindicación 17a ó 18a, en el que el disolvente miscible en



agua es alcohol isopropílico o etanol a una concentra
ción en dicho eluato de 70 a 97% en volumen.

5 23a.- Un procedimiento según la rei-
vindicación 19a, en el que el disolvente miscible en
agua es alcohol isopropílico o etanol a una concentra-
ción de al menos 90% en volumen.

10 24a.- Un procedimiento según la reivin-
dicación 15a, en el que la sal del ácido clavulánico
con una resina básica de intercambio iónico se forma
por contacto de dicha resina con un caldo de fermenta-
ción que contiene ácido clavulánico y/o una sal del mis
mo.

15 25a.- Un procedimiento según la reivin-
dicación 15a, en el que la sal de ácido clavulánico
con una resina básica de intercambio iónico se forma
poniendo en contacto dicha resina con un eluato formado
por elución con un disolvente acuoso miscible en agua
de un adsorbato de carbón vegetal de ácido clavulánico
y/o una sal del mismo.

20 26a.- Un procedimiento según la reivindi-
cación 25a, en el que dicho disolvente acuoso miscible
en agua es acetona acuosa.

25 27a.- Un procedimiento según la reivindi-
cación 26a, en el que la acetona es acetona acuosa del 30 al 95%.

25 28a.- Un procedimiento según cualquiera



de las reivindicaciones 25^a a 27^a, en el que el adsorbato de carbón vegetal se produce poniendo en contacto el carbón vegetal con un caldo de fermentación que contiene ácido clavulánico y/o una sal del mismo.

5 29^a.- Un procedimiento según la reivindicación 28^a, en el que la cantidad de carbón vegetal empleada es justo suficiente para adsorber todo el ácido clavulánico y/o su sal del mismo.

10 30^a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15^a a 29^a, en el que dicha resina básica de intercambio iónico lleva amino terciarios o grupos de amonio cuaternario.

15 31^a.- Un procedimiento según la reivindicación 30^a, en el que dicha resina es una resina de poliestireno, epoxi-poliamina, de poliamina fenólica, de dextrano reticulado o de poliacrilato.

20 32^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, en el que se extrae una solución fenólica de ácido clavulánico con hidróxido de litio acuoso y el clavulanato de litio así formado se aísla del extracto acuoso así formado.

25 33^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, en el que la sal de ácido clavulánico empleada como material de partida se prepara por extracción de una solución fenólica del ácido clavulánico y/o una



sal del mismo con una solución acuosa de una base para formar un extracto acuoso que contiene dicha sal.

5 34a.- Un procedimiento según la reivindicación 32a o 33a, en el que dicha extracción se efectúa con el pH de la fase acuosa a aproximadamente 6,5.

10 35a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 32a a 34a, en el que el extracto acuoso se pone en contacto con un disolvente inmiscible en agua para separar el disolvente fenólico del mismo.

15 36a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 32a a 35a, en el que la solución fenólica se prepara poniendo en contacto carbón vegetal o una resina básica de intercambio iónico con un caldo de fermentación que contiene ácido clavulánico y/o una sal del mismo, eluyendo el ácido clavulánico o una sal del mismo con un eluyente acuoso, concentrando el eluato, si se desea, precipitando las impurezas orgánicas no deseadas por adición de uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua y/o separando dichas impurezas por extracción con un disolvente inmiscible en agua, extrayéndose luego la solución acuosa concentrada de ácido clavulánico y/o una sal del mismo con un disolvente fenólico.

25 37a.- Un procedimiento según la reivindi

3.2.76



5 cación 41a, en el que el clavulanato de litio se pone en contacto en solución acuosa con una resina de intercambio catiónico en forma de catión, siendo dicho catión el de la sal del ácido clavulánico que se requiere, seguido por elución de la sal deseada.

10 43a.- Un procedimiento según la reivindicación 41a ó 42a, en el que dicha otra sal del ácido clavulánico es una sal de metal alcalino distinta de la sal de litio, una sal de metal alcalino-térreo, la sal de amonio o una sal de base orgánica del ácido clavulánico.

15 44a.- Un procedimiento según la reivindicación 41a, en el que dicha otra sal es la sal de sodio o de potasio de ácido clavulánico.

20 45a.- Un procedimiento según la reivindicación 41a, en el que dicha otra sal es la sal de amonio, metilamina, trietilamina o piperidina del ácido clavulánico.

25 46a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1a-4a, en el que el clavulanato de litio se convierte subsiguientemente en ácido clavulánico.

3.2.76 47a.- Un procedimiento según la reivindicación 46a, en el que el clavulanato de litio en solución acuosa de elevada fuerza iónica se acidifica en pre

sencia de un disolvente orgánico inmiscible en agua con lo que se obtiene una solución de ácido clavulánico en dicho disolvente.

5 48a.- Un procedimiento según la reivindicación 46a, en el que el disolvente se separa de dicha solución de ácido clavulánico.

49a.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE IMPUREZAS CONTAMINANTES DEL ACIDO CLAVULANICO.


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

Esta Memoria consta de setenta y siete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 16. ABR. 1977

15

P.A. Fernando G. Elviro
Por Poder



20

25

15.4.77

JMM/.



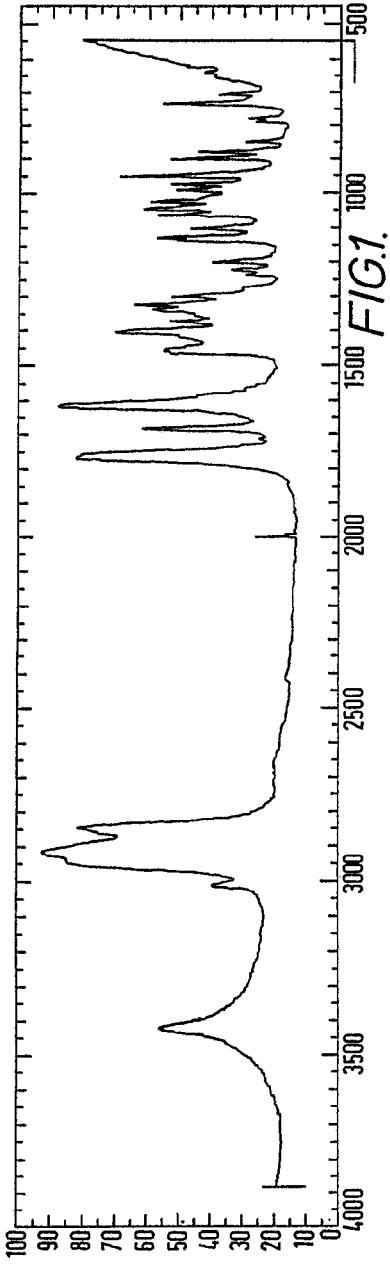


FIG. 2.

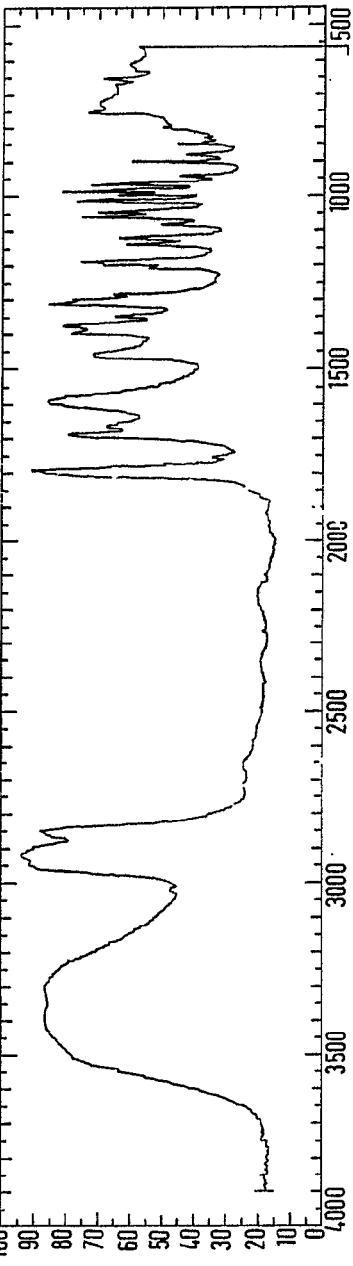
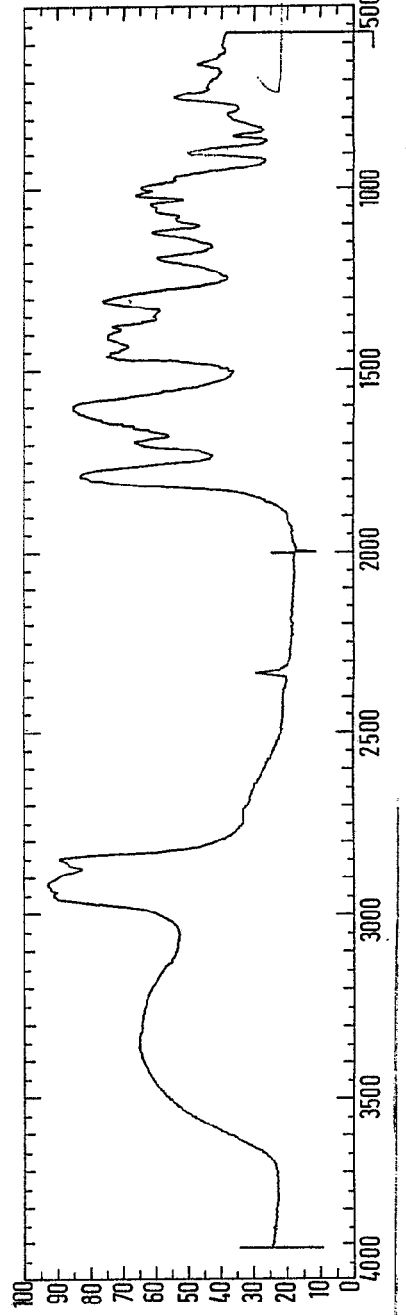


FIG. 3.



500 Trans. No. de Eizaburu
Por rease.

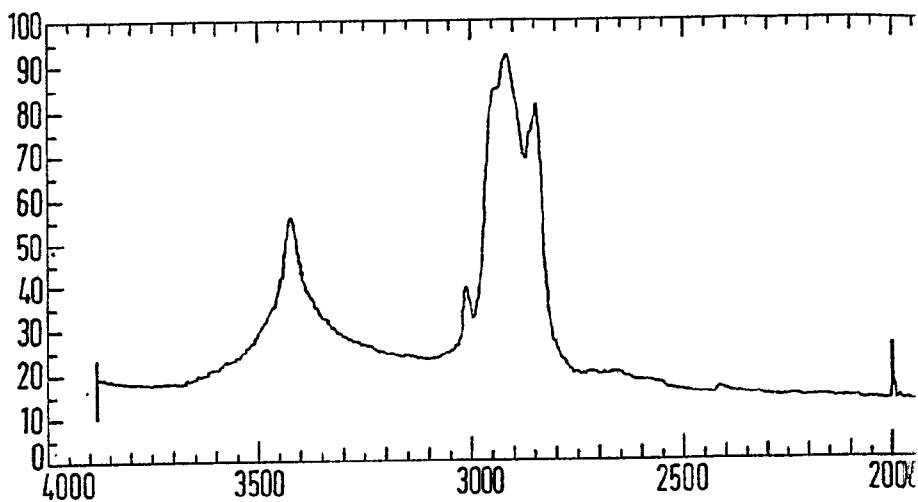


FIG.2.

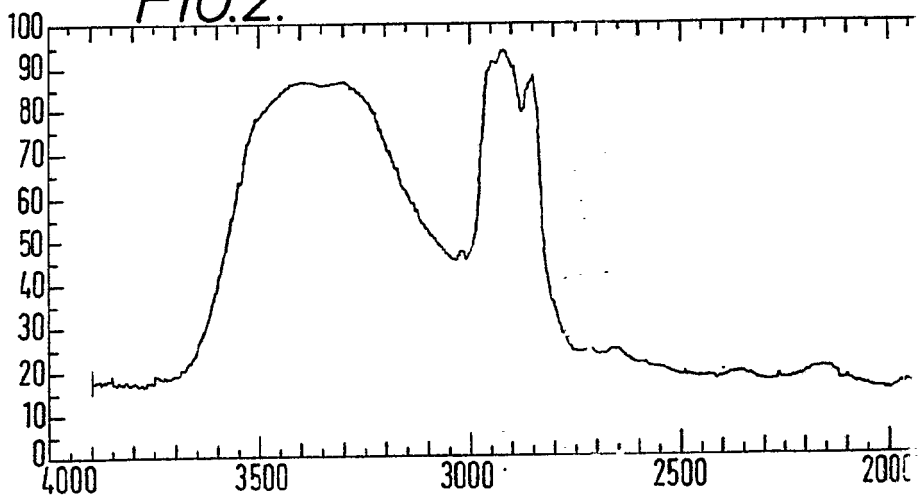
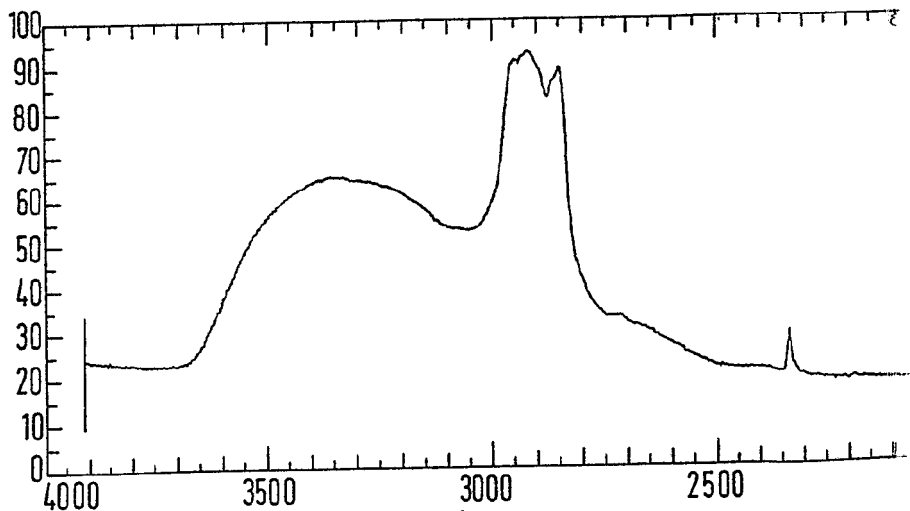


FIG.3.



I/I

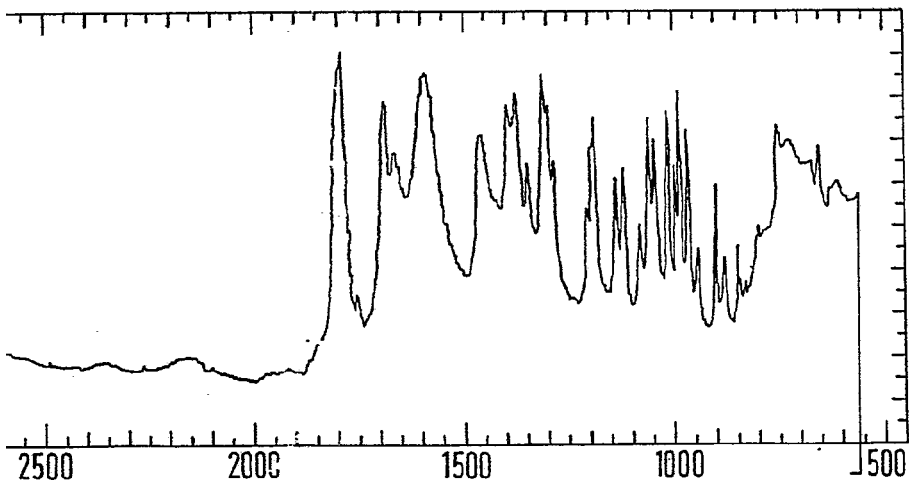
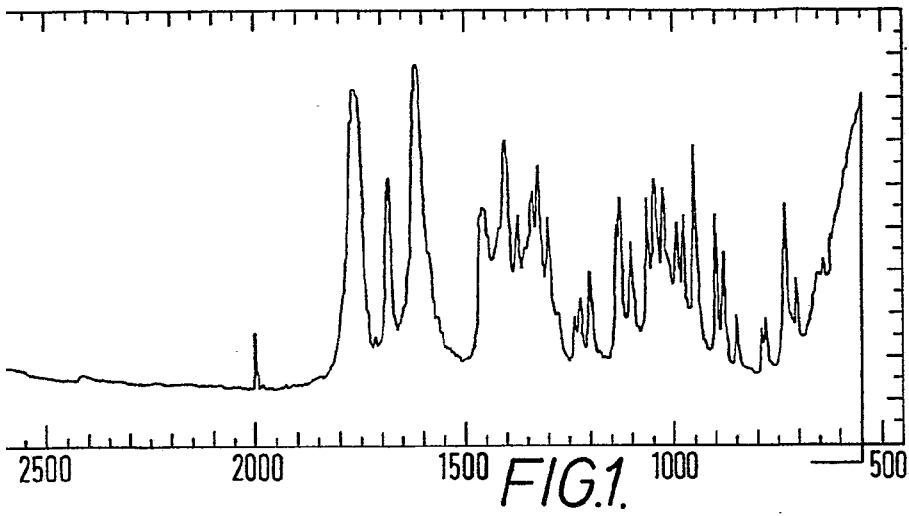
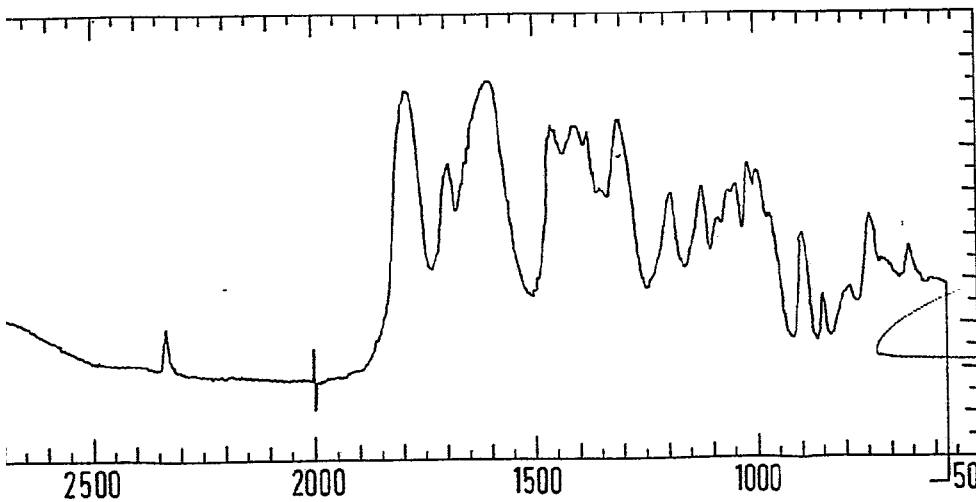


FIG. 3.



Ferreiro de Elizaburu
Por todos.