



19 ES	11	NUMERO	10 A 1
	21	447.640	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		6.5.76	

P.- 62.943

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
55012/75	7-5-75	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR 3-AMINO-1-(α -CARBOXI-4-HIDROXIBEN
CIL)-2-AZETIDINONA"

71 SOLICITANTE (S)
FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO.,

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
No. 3, 4-Chome, Doshomachi, Higashi-Ku, Osaka-Shi, Japón

72 INVENTOR (ES)
Kiyohiko Kunugita, Hatsuo Aoki, Hiroshi Imanaka

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ

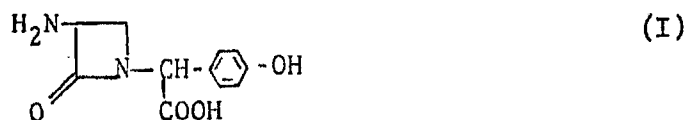
P.- 62.943

1 La presente invención se refiere a un nuevo pro-
cedimiento para la preparación de una nueva sustancia,
3-amino-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidionona, que
es útil como un intermedio clave para preparar derivados de
5 3-acilamino azetidionona.

De manera más particular, se refiere a un nuevo
procedimiento para preparar 3-amino-1-(alfa-carboxi-4-hidro-
xi-bencil)-2-azetidionona a partir de 3-(alfa-sustituída o
insustituída glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)
10 -2-azetidionona mediante N-desacilación enzimática.

El compuesto objeto de la presente invención, la
3-amino-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidionona (a
la cual se hace referencia más adelante como 3-ANA), es no-
vedosa y está representada por la fórmula (I) siguiente:

15



20 Como resultado de las investigaciones hechas so-
bre varias clases de microorganismos y enzimas, los invento-
res de la presente invención han encontrado recientemente
que existen ampliamente microorganismos y una enzima deriva-
dos de un cierto cuerpo animal que tienen la actividad de
25 N-desacilar una 3-(alfa-sustituída o insustituída glicina-
mido)-1-alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidionona para
producir la 3-ANA. Y se ha encontrado asimismo, que esta con-
versión se debe a la capacidad de los microorganismos o la
enzima que hidrolizan en enlace de la amida de ácido en la
30 tercera posición de la 3-(alfa-sustituída o insustituída

1 glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidino-
na.

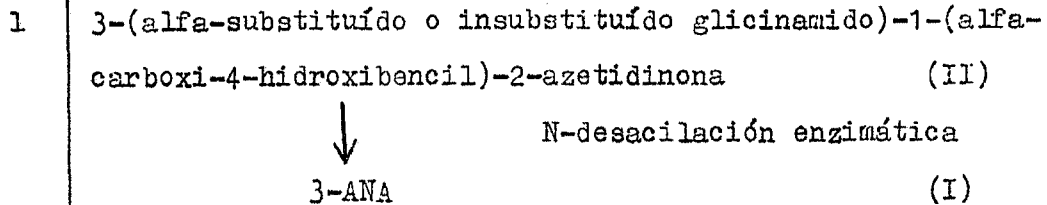
De acuerdo con lo anterior, un objeto de la presente invención es el de proveer una nueva sustancia, la
5 3-ANA.

Otro objeto de la presente invención es el de proveer un nuevo procedimiento para la preparación de una nueva sustancia, la 3-ANA, a partir de la 3-(alfa-substituída o insubstituída glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-
10 bencil)-2-azetidina mediante N-desacilación enzimática.

Aún otro objeto de la presente invención es el de proveer un nuevo procedimiento que es más económico para la preparación industrial de la 3-ANA.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto objeto, la 3-ANA (I), se puede preparar a partir de la
15 3-(alfa-substituído o insubstituído glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidina por medio de una N-desacilación enzimática en presencia de un caldo de cultivo de un microorganismo, su material procesado o una aminopeptidasa derivada de un cuerpo animal, cada uno de los cuales es capaz de hidrolizar el enlace de la amida de ácido de
20 la 3-(alfa-substituído o insubstituído glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidina. De manera más particular, esta N-desacilación enzimática se lleva a cabo poniendo en contacto una 3-(alfa-substituído o insubstituído glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidina con
25 un caldo de cultivo del microorganismo o su material procesado, o una aminopeptidasa derivada de un cuerpo animal.

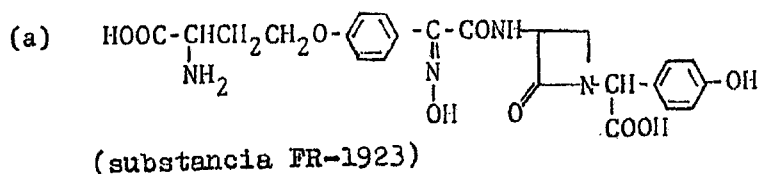
La reacción de la presente invención se puede ilustrar mediante el esquema siguiente
30



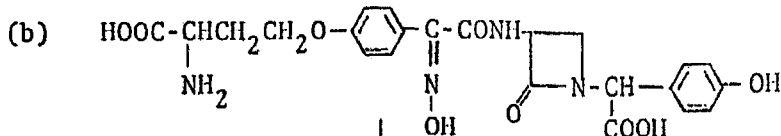
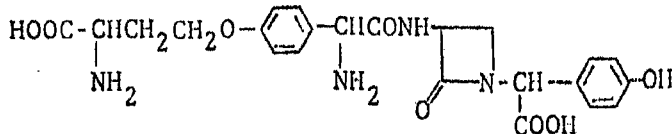
5 Respecto al compuesto de partida (I) que se va a
usar en la presente invención, debe quedar entendido que es
esencial que este compuesto de partida tenga un grupo alfa-
-substituído (o insubstituído)-alfa-amino-acetoamido en la
tercera posición en el esqueleto de la azetidínona, y que
10 es un descubrimiento nuevo que este compuesto pueda ser
N-desacilado enzimáticamente para producir la 3-ANA. En
otras palabras, es esencial que, para la N-desacilación en-
zimática de la presente invención, un grupo acilamino en
la tercera posición del compuesto de partida (II) tenga
15 siempre un grupo amino en la posición alfa de la parte aci-
lo.

La 3-(alfa-substituído o insubstituído glicinami-
do)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidínona (II) que
se va a usar como compuesto de partida, es un nuevo compues-
20 to y se puede preparar a partir de un compuesto conocido,
sustancia antibiótica FR-1923 de acuerdo con los métodos,
por ejemplo como se ilustra en los esquemas (a) y (b) que
siguen. Incluso, debe hacerse notar que esta sustancia an-
tibiótica FR-1923 se describe en, por ejemplo, la Patente
25 de los Estados Unidos Nº 3.923.977, en la cual la substan-
cia antibiótica FR-1923 está definida sólo por varias pro-
piedades físico-químicas sin descripción alguna de la es-
tructura química, pero, como resultado de investigaciones
adicionales, su estructura química ha sido definida, identi-
30 ficada y asignada, y la identificación de la estructura pri-

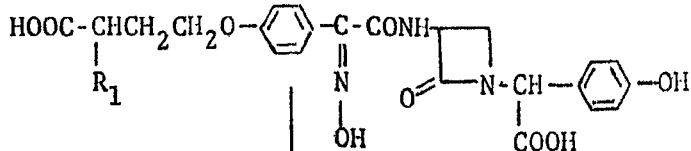
1 meramente ha dado un estímulo científico a los inventores
 para producir la 3-ANA como intermedio clave para sinteti-
 5 zar los otros compuestos químicamente modificados, por
 ejemplo el otro derivado de la 3-acilamino azetidionona a
 parte de la sustancia FR-1923. Y, además, debe quedar en-
 tendido que la sustancia FR-1923 no es enzimáticamente de-
 sacilada para producir la 3-ANA y el derivado 3-(alfa-ami-
 no)acil azetidionona de la sustancia FR-1923 son enzimáti-
 camente desaciladas para producir 3-ANA, cuyo hecho es un
 10 nuevo descubrimiento.



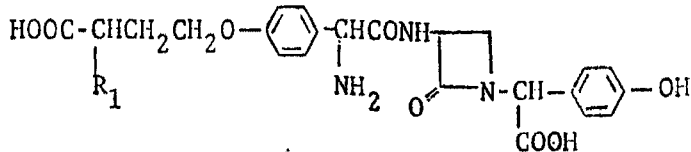
reducción



acilación



reducción

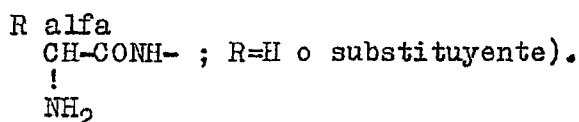


1 en donde R₁ es un grupo acilamino.

Según antes se ha ejemplificado en la presente, la esencia y el quid de la presente invención residen en el descubrimiento de que sólo la 3-(alfa-substituído o in-

5 substituído glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidiona (II) puede ser enzimáticamente desacetilada para dar 3-ANA (I) y por lo tanto, es un punto esencial de la invención, que una función amino esté ligada al átomo de carbono alfa del grupo acilamino ligado en la tercera

10 posición del compuesto de partida (II) (es decir,



Bajo una situación tal, un sustituyente (R) en

15 la mitad 3-(alfa-substituído o insubstituído glicinamido) del compuesto de partida (II) no es un factor tan importante como el quid de la presente invención y no es restrictivo de tal manera que el sustituyente (R) puede incluir cualquier clase del residuo orgánico conocido en la técnica,


20 cuyos ejemplos preparados se explican por referencia, haciéndose referencia a un residuo de hidrocarburo acíclico saturado o insaturado (por ejemplo alquilo, alquenilo, etc.); residuo hidrocarburo cíclico saturado o insaturado (por

ejemplo cicloalquilo, cicloalquenilo, etc.); residuo hidro-

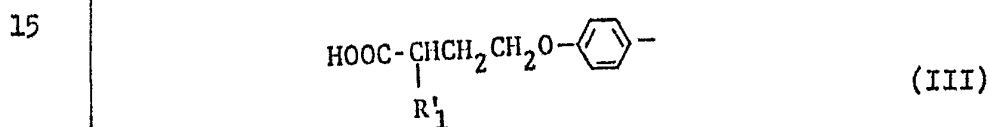
25 carburo aromático (por ejemplo fenilo, etc.); residuo heterocíclico tal como un grupo heterocíclico de 5 o 6 miembros que contiene cuando menos un hetero átomo (S, O y N) (por

ejemplo tienilo, etc.); grupo heterocíclico benceno-fusionado (por ejemplo indolilo, etc.), etc.; y un residuo que con-

30 tiene su combinación opcional tal como cicloalquil-alquilo

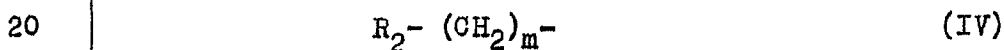
1 aralquilo, alquilo heterocíclico, etc.). Y en el residuo
 orgánico anterior, la mitad hidrocarburo puede estar opcio-
 nalmente interrumpida por cuando menos un radical de un he-
 tero átomo (por ejemplo -C-, -N-, -S-, etc.), un grupo ató-
 5 mico (por ejemplo -SO-, -SO₂-, -NH-, etc.), anillo aromáti-
 co bivalente (por ejemplo , etc.), y/o anillo hetero-
 cíclico bivalente, y además este residuo hidrocarburo, ani-
 llo aromático y/o anillo heterocíclico puede llevar cuando
 menos un sustituyente adecuado tal como hidroxil, halógeno,
 10 carboxi, amino, hidroxilimino, oxo, ciano, sulfo, y simila-
 res.

Como ejemplo representativo del sustituyente (R)
 arriba definido, se ejemplifica un grupo según se ilustra
 por la fórmula siguiente.



En donde R'₁ es un grupo amino o un grupo acilamino.

ó



en donde R₂ es un grupo arilo sustituido o un grupo hetero-
 cíclico y m es un entero de 0 a 4.

Ejemplos que se prefieren del grupo acilamino pa-
 25 ra R'₁ de la fórmula (III) anterior, pueden ser alcanoilo
 (C₁-C₆) por ejemplo formilo, acetilo, propionilo, butirilo,
 valerilo, hexanoilo y similares, alquenoilo (C₃-C₆) por ejem-
 plo acrililo, crotonilo, metacrililo y similares, alquil-
 carbamoilo (C₂-C₆) por ejemplo N-metilcarbamoilo, N-etilcar-
 30 bamoilo, N-propilcarbamoilo y similares, aroilo (C₇-C₁₂) tal

1 como benzoilo, toluoilo, naftoilo y similares, aralcanoilo
lo(C₇-C₁₂) tal como fenilacetilo y similares, arilcarbamoilo
lo(C₇-C₁₂) tal como N-fenilcarbamoilo, N-naftilcarbamoilo
5 y similares, carbonilo heterocíclico tal como tenoilo, fu-
roilo, nicotinoilo y similares.

Ejemplos preferidos del grupo arilo substituído
para R₂ de la fórmula (IV) anterior, pueden ser hidroxiari-
lo(C₇-C₁₂) tal como p-hidroxifenilo, p-hidroxi-naftilo y si-
milares y haloarilo(C₇-C₁₂) tal como m-clorofenilo y simi-
10 lares, etc.

Ejemplos preferidos del grupo heterocíclico para
R₂ de la fórmula (IV) anterior pueden ser tienilo, furilo,
indolilo, piridilo y similares.

El compuesto de partida (II) de la presente in-
15 vención incluye los derivados en el grupo carboxi y sus sa-
les. Lo que sigue son ejemplos representativos de los deri-
vados en el grupo carboxi y sus sales.

(a) Ester: un éster alifático tal como éster de metilo, és-
ter de propilo, éster de vinilo, éster de alilo, éster
20 de etinilo y similares.

(b) Sal: una sal con una base inorgánica u orgánica, por
ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio,
sal de calcio, sal de amonio, sal de dicitclohexilamina,
sal de piridina, sal de etanolamina y similares.

25 Los microorganismos que tienen actividad para la
N-desacilación del compuesto de partida (II) para producir
la 3-ANA, que se van a usar en la presente invención, se
pueden aislar fácilmente de la tierra y otras fuentes, por
medios convencionales, y además se pueden elegir fácilmen-
30 te asimismo, de los cultivos recogidos adecuados en insta-

1 laciones públicas para recolección de cultivos tales como
 ATCC (American Type Culture Collection, Maryland, EUA),
 IAM (Institute of Applied Microbiology, Universidad de To-
 5 kio, Japón), IPO (Institute For Fermentation, Osaka, Ja-
 pón), HUT (Hiroshima University, Faculty of Engineering,
 Hiroshima, Japón), IID (The Institute for Infectious Disea-
 ses, University of Tokio, Tokio, Japón), CBS (Centraalbu-
 reau voor Schimmelcultures, Bearn, Países Bajos), FERM
 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial
 10 Science and Technology, Chiba, Japón) y NRRL (Northern Uti-
 lization Research and Development Division, E.U. Department
 of Agriculture, Illinois, EUA), y similares.

Como ejemplos concretos de los microorganismos
 anteriores, se ejemplifican los siguientes en la Tabla 1.

15

Tabla 1

Género	Microor- ganismo número	Cepa
Pseudomonas	1	Pseudomonas schuykiliensis I A M 1126
	2	Pseudomonas aureofaciens I F O 3523
	3	Pseudomonas putrefaciens I F O 3909
	4	Pseudomonas riboflavina I F O 3140
Xanthomonas	5	Xanthomonas campestris I A M 1671
Acetobacter	6	Acetobacter acetosus I A M 1803
	7	Acetobacter rancens I A M 1825
Gluconobacter	8	Gluconobacter capsulatus I A M 1813

25

30

	Género	Microor- ganismo número	Cepa
1			
5	Escherichia	9	Escherichia coli I A M 1204
	Proteus	10	Proteus vulgaris I I D OX19US
	Staphylococcus	11	Staphylococcus aureus I A M 1011
10	Aeromonas	12	Aeromonas hydrophila I A M 1018
	Protaminobacter	13	Protaminobacter alboflavus I A M 1040
	Bacillus	14	Bacillus subtilis I A M 1069
		15	Bacillus cereus I A M 1072
15		16	Bacillus megaterium I A M 1166
	Azotobacter	17	Azotobacter vinelandii I A M 1078
	Agrobacterium	18	Agrobacterium tumefaciens I A M 1037
20	Brevibacterium	19	Brevibacteriu, ammoniagenes I A M 1641
	Micrococcus	20	Micrococcus luteus I A M 1097
	Microbacterium	21	Microbacteriu, flavum I A M 1642
25	Mycobacterium	22	Mycobacterium tuberculosis I I D H37RV
	Achromobacter	23	Achromobacter cycloclastes I A M 1013
	Aerobacter	24	Aerobacter aerogenes I A M 1019
	Alcaligenes	25	Alcaligenes faecalis I A M 1015
30			

1

5

10

15

20

25

30

Género	Microor- ganismo número	Cepa
Corynebacterium		Corynebacteriu, fascians I A M 1079
Flavobacterium	27	Flavobacterium arborescens I P O 3750
Kluyvera	28	Kluyvera citrophilia A T C C 21285
Arthrobacter	29	Arthrobacter simplex I A M 1660
Sarcina	30	Sarcina lutea I A M 1099
Serratia	31	Serratia marcescens I A M 1067
Streptomyces	32	Streptomyces arabicus I F O 3406
	33	Streptomyces fradiae I F O 3123
	34	Streptomyces olivaceus I F O 3200
	35	Streptomyces shindenensis I F O 3399
Nocardia	36	Nocardia asteroides I F O 3384
Micromonospora	37	Micromonospora purpurea I F O 12575
Thermopolyspora	38	Thermopolyspora polyspora I F O 12134
Amorphosporangium	39	Amorphosporangium auranti- color I F O 12245
Spirillospora	40	Spirillospora albida I F O 12248
Actinoplanes	41	Actinoplanes armeniacus I F O 12555
Aspergillus	42	Aspergillus oryzae I A M 2630

	Género	Microor- ganismo número	Cepa
1			
5	Penicillium	43	Penicillium casei I A M 7284
		44	Penicillium chrysogenum I A M 7106
	Rhizopus	45	Rhizopus delemar I A M 6038
10	Mucor	46	Mucor fragilis I A M 6140
	Rhodotorula	47	Rhodotorula rubra I F O 0002
	Endomycopsis	48	Endomycopsis capsularis H U T 7236
15	Lipomyces	49	Lipomyces starkeyi H U T 7263

20

La presente invención incluye asimismo, dentro de su ámbito, el uso de mutantes producidos de estos microorganismos por medios convencionales tales como rayos X, radiación ultravioleta, tratamiento con materiales químicos tales como ácido nítrico, gas de mostasa de nitrógeno, azaserina, 2-aminopurina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y similares.

25

Sin embargo, en cualquier régimen, debe quedar entendido que un microorganismo usado en la presente invención no se encuentra limitado al género, especie y su mutante según arriba se ha indicado.

30

De acuerdo con la presente invención, los microorganismos, de preferencia, se pueden usar en una forma de un caldo cultivado obtenido mediante el cultivo del microorga-

1 mismo de una manera adecuada, o su material procesado.

El cultivo de estos microorganismos se puede llevar a cabo por lo general, de una manera convencional, y se puede llevar a cabo ventajosamente bajo aereación con agitación. Como medio de cultivo que se puede usar, un nutritivo que contiene fuentes de carbón asimilable y nitrógeno y sales inorgánicas. Las fuentes de carbono preferidas son, por ejemplo, glucosa, sucrosa, lactosa, glicerol o almidón. Las fuentes de nitrógeno preferidas son, por ejemplo, extracto de carne, peptona, harina de gluten, harina de maíz, harina de semilla de algodón, harina de frijol de soya, licor de maceración de maíz, extractos de levadura, caseína hidrolizada y amino ácidos, así como nitrógeno orgánico e inorgánico tal como las sales de amonio (por ejemplo nitrato de amonio, fosfato de amonio, etc.). Si se desea, se puede usar asimismo sales minerales tales como carbonato de calcio, fosfato de sodio o de potasio, sales de magnesio y sales de cobre, y varias vitaminas.

Con el fin de elevar la actividad del caldo cultivado o su material procesado, que sea capaz de N-desacilar el compuesto de partida (II) para producir la 3-ANA (I), se puede añadir una pequeña cantidad de substancia FR-1923 o el compuesto de partida (II) como estimulante para el medio de cultivo que se va a usar.

El pH adecuado del medio de cultivo, temperatura de cultivo adecuada y tiempo de cultivo adecuado varían con la clase de microorganismo que se use. Un pH conveniente habitualmente reside en la escala de pH de 5 a 8. La temperatura se elige habitualmente, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C, de preferencia de 27°C a 33°C. El tiempo

1 de cultivo se elige por lo general, de 24 horas a 120 horas, prefiriéndose un tiempo de 40 a 100 horas.

5 El caldo cultivado per se obtenido de esta manera y su material procesado se puede usar para la preparación de la 3-ANA. En la presente, el material procesado del caldo cultivado, quiere decir cualquier preparación que contenga actividad de N-desacilación enzimática y que haya sido procesado mediante medios convencionalmente adecuados para aumentar esta actividad de N-desacilación.

10 La actividad de N-desacilación del caldo cultivado se encuentra presente en las células (intracelular) y/o fuera de las células (extracelular).

15 Cuando la actividad existe principalmente en las células, la preparación siguiente, por ejemplo, se puede usar como un material procesado del caldo cultivado.

(1) células en bruto; separadas del caldo cultivado de maneras convencionales tales como filtración y centrifugación,

20 (2) células secas; obtenidas mediante el secado de las células en bruto por medios convencionales tales como liofilización y secado al vacío,

(3) un extracto exento de célula; obtenido mediante la destrucción de las células en bruto o secas por medios convencionales (por ejemplo moliendo las células con almina, arena de mar, etc., o tratando las células con ondas supersónicas), o

25 (4) una solución de enzima; obtenida mediante la purificación o purificación parcial del extracto exento de células de una manera convencional.

30 Cuando la actividad existe principalmente fuera

1 de las células, se puede usar la siguiente preparación, por ejemplo, como un material procesado.

(1) un supernatante o un filtrado; obtenido del caldo cultivado de una manera convencional, o

5 (2) una solución de enzima; obtenida mediante la purificación o purificación parcial del supernatante o filtrado citados de una manera convencional.

Además, un derivado de aminopeptidasa de un cuerpo animal que se va a usar en la presente invención es conocido como una enzima hidrolizante N-terminada de dipéptido y oligopéptido.

Como ejemplos representativos de esta enzima, se puede ejemplificar la Aminopeptidasa M que existe en un tejido animal tal como un riñón de cerdo (E.C. 3.4.1.2) (Véase The Enzyme, volumen 3, página 102) y similares.

La aminopeptidasa se puede usar no sólo en estado purificado, sino también en estado crudo. Es decir, hasta donde el estado de la enzima no tenga influencia adversa sobre la reacción, se puede usar la aminopeptidasa en el estado de un extracto exento de célula que contenga la aminopeptidasa, o en el estado de enzima obtenida mediante purificación o purificación parcial del extracto exento de célula de una manera convencional para la purificación de las enzimas.

25 La reacción de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto de partida (II) con el caldo de cultivo del microorganismo o su material procesado, o la aminopeptidasa.

La reacción enzimática se puede llevar a cabo de preferencia, en un medio acuoso tal como agua o una solución

1 amortiguadora. Es decir, la reacción habitualmente se puede
llevar a cabo mediante la adición del compuesto de partida
(II) al caldo de cultivo del microorganismo per se ó su ma-
terial procesado líquido (por ejemplo supernatante, filtra-
5 do, solución de enzima, etc.), o a la solución o suspensión
del caldo de cultivo o su material procesado o una prepara-
ción de aminopeptidasa derivada de un cuerpo animal en el
medio acuoso. Algunas veces, se prefiere una agitación de
la mezcla de reacción.

10 El pH que se prefiere para la mezcla de reacción,
concentración de sustratos, tiempo de reacción y tempera-
tura de reacción puede variar con las características del
caldo cultivado o su material procesado, o la aminopepti-
dasa que se va a usar, o el compuesto de partida (II) que
15 se va a usar. Sin embargo, estas condiciones de reacción se
eligen de preferencia de una escala de: pH de 4 a 10, a 20-
60°C durante 30 minutos a 50 horas. La concentración del
compuesto de partida (II) para uso como sustrato en la mez-
cla de reacción, se elige de preferencia de una escala de
20 0,1-100 mg por mililitro.

Además, la reacción de la presente invención pue-
de incluir asimismo un procedimiento de cultivo del micro-
organismo en un medio de cultivo que contenga el compuesto
de partida (II) para producir la 3-ANA (I) en el medio de
25 cultivo.

El compuesto objeto, 3-ANA (I), preparado de esta
manera en la mezcla de reacción se puede separar o recuperar
de la mezcla de reacción de una manera convencional.

Se puede incluir, dentro del ámbito de la presente
30 invención, el caso donde el derivado o las sales en el gru-

1 po carboxi del compuesto de partida (II) se convierte al grupo carboxi libre correspondiente en el curso de la reacción, post-tratamiento de la mezcla de reacción, o aislamiento o purificación del compuesto objeto.

5 El compuesto objeto, la 3-ANA así obtenida, es un nuevo intermedio clave para la preparación del otro u otros derivados de 3-acilamino azetidinona. A este respecto, debe quedar entendido que la 3-ANA de la presente invención se puede decir que corresponde al ácido 6-amino penicilánico (6-APA) en el campo de la penicilina y al ácido 10 7-aminocefalosporánico (7-ACA) en el campo de la cefalosporina. Es decir, 6-APA se encontró mediante la desacilación de la penicilina G que produjo la fermentación de Penicillium chrysogenum y luego primeramente se pudieron preparar 15 muchas penicilias semi-sintéticas por medio de la acilación de 6-APA, y también 7-ACA se encontró por la desacilación de la cefalosporina C que se produjo por la fermentación de Cephalosporium acremonium y luego primeramente han sido preparadas muchas cefalosporinas semisintéticas mediante la 20 acilación de 7-ACA.

La posición y el valor de 3-ANA en el nuevo y único campo antibiótico de azetidinona son bastante iguales a aquellos de la 6-APA y 7-ACA.

25 Es decir, la 3-ANA que se puede derivar de la sustancia FR-1923 producida mediante la fermentación de Mocardia uniformis var. tsuyamanensis puede proporcionar el intermedio clave para producir muchos otros derivados de 3-acilamino azetidinona antibial mejoras y útiles. Como un ejemplo de este derivado que se prepara mediante la acilación de 30 3-ANA, se ejemplifica la 1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-

1 -3-[2-(2-(4-cloro-2-nitrofenoxi)-acetamido)-2-(2-tienil)
acetamido]-2-azetidiona que está mejorada en la actividad
antimicrobial contra bacterias gram-positivas patogénicas.

5 Se proporcionan los ejemplos siguientes con el
propósito de ilustrar la presente invención.

En los Ejemplos siguientes, la producción del
compuesto objeto, la 3-ANA producida en la mezcla de reac-
ción, se confirmó cualitativa o cuantitativamente como si-
gue:

10 (1) Un método para prueba cualitativa del compuesto objeto:

Se mancharon 10 microlitros de la mezcla de reac-
ción sobre Celulosa Eastman Chromagram Sheet 13254 (marca
comercial de Eastman Kodak Co.) y luego se sometieron a
cromatografía de capa delgada usando una mezcla de n-propa-
nol y agua (1:1) como disolvente de revelado y usando nin-
hidrina como reactivo producto de color. La mancha del com-
puesto objeto, 3-ANA, se detectó como una mancha púrpura
cercana al valor Rf de 0,77.

(2) Un método para determinar el compuesto objeto:

20 Se sometieron 40 microlitros de la mezcla de reac-
ción a cromatografía de capa delgada usando una hoja de ce-
lulosa substancialmente de la misma manera arriba descrita
en el método cualitativo anterior. La mancha del compuesto
objeto se detectó como una mancha de absorción ultravioleta
25 cercana al valor Rf de 0,77 mediante el uso de una lámpara
UV (2536 Å), se separó mediante espátula de la hoja y luego
se puso en un tubo de prueba. Se vertieron cuatro mililitros
de solución acuosa de hidróxido de sodio 0,1N en el tubo de
prueba y luego el tubo de prueba se dejó reposar durante 10
30 minutos. Subsecuentemente, la mezcla en el tubo de prueba se

1 centrifugó a 2.500 rpm durante 5 minutos para dar un super
natante. La intensidad de la absorción ultravioleta del su
pernatante a 247 nm se midió y el rendimiento de la 3-ANA
se calculó sobre la base del valor ϵ de 12.000 de una
5 muestra auténtica del compuesto objeto a 247 nm.

Ejemplo 1

Se esterilizó de una manera convencional, 100 mi-
lilitros de un medio de cultivo (pH 7,2) que contenía 2%
de "Kyokuto powdery Bouillon" (marca comercial de Kyokuto
10 Seiyaku Kogyo Co., Ltd.) en un matraz Sakaguchi (capacidad:
500 ml) y luego se inoculó con un cultivo al sesgo de dos
días de Pseudomonas schuylkiliensis IAM 1126. El organismo
se desarrolló en el medio a 30°C durante 48 horas en un agi-
tador. Seis horas después partiendo del desarrollo, se aña-
15 dieron al medio 0,5 mg de 3-[2-(4-(3-amino-3-carboxipropo-
xi)fenil)glicinamido]-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-
-azetidionona. Después de cultivar, el caldo cultivado se
centrifugó a 5.000 rpm durante 15 minutos para dar un su-
pernatante. Se añadió al supernatante 1 gramo de 3-[2-(4-
20 -(3-amino-3-carboxipropoxi)-fenil)glicinamido]-1-(alfa-
-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidionona, y la solución se
ajustó a un pH de 7,0, seguida por incubación a 37°C duran-
te 4 horas. Tras de incubar, 120 mg de 3-ANA se determinaron
en la mezcla de reacción. Subsecuentemente, 50 ml de la mez-
25 cla de reacción se hicieron pasar a través de una columna
empacada con carbón activado en forma granular. La columna
se lavó con 500 ml de agua y 500 ml de metanol acuoso 50%
en ese orden, tras de lo cual el compuesto objeto se eluyó
con 1500 ml de acetona acuosa 50%. Se concentraron 1500 ml
30 del eluato bajo presión reducida para dar un concentrado

1 (50 ml) y luego se le añadieron 250 ml de acetona, tras de
lo cual se eliminó el material insoluble por filtración.
El filtrado se concentró bajo presión reducida y 20 milili
5 tros del concentrado se ajustaron a un pH de 2,0, al cual
se añadieron 20 ml de n-butanol. La solución se agitó y lue
go se separó la capa de n-butanol, después se añadieron
100 ml de éter de dietilo a la capa de n-butanol. La mezcla
se filtró para dar 40 mg de polvo blanco, que se disolvió
en un pequeño volumen de metanol y se dejó reposar durante
10 la noche a la temperatura ambiente para dar 33 mg de cris
tales blancos de 3-ANA.

P. de f. 203-206°C (Descomposición)

Espectro de absorción infrarroja:

max: 3140, 2400 - 1700, 1765, 1745, 1585 cm^{-1}

15 Ejemplo 2

Células de Pseudomonas schuylliensis IAM 1126,
se separaron por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 mi
nutos de un caldo cultivado obtenido mediante substancial
mente la misma manera descrita en el Ejemplo 1, se lavaron
20 con 50 ml de solución de amortiguador de fosfato 0,15 M
(pH 7,0) y luego se centrifugó de nuevo. Las células obte
nidas se suspendieron en la misma solución de amortiguador
como arriba se ha mencionado, para dar 10 mililitros de sus
pensión. Se añadió a la suspensión, 10 mililitros de una so
25 lución acuosa (pH 7,0) que contenía 1 g de 3- $\left[2-\left\{ 4-(3\text{-ami}\right. \right.$
no-3-carboxipropoxi)fenil}glicinamido]-1-(alfa-carboxi-4-
-hidroxibencil)-2-azetidiona, tras de lo cual la mezcla se
incubó a 37°C durante 4 horas. Después de la reacción, se
determinaron 170 mg de 3-ANA en la mezcla de reacción. Sub
30 secuentemente, la mezcla de reacción se centrifugó para dar

1 un supernatante y 48 mg de cristales blancos de 3-ANA se
obtuvieron del supernatante mediante substancialmente el
mismo procedimiento de purificación descrito en el Ejemplo
1. El espectro de absorción infrarrojo de este compuesto
5 objeto fué idéntico a aquel de una muestra auténtica de
3-ANA y no se observó descenso del punto de fusión del com-
puesto objeto en el examen mezclado.

Ejemplo 3

10 Se esterilizó de una manera convencional, 100 mi-
lilitros de un medio de cultivo (pH 7,2) que contenía 2%
de "Kyokuto Powdery Bouillon" en cada uno de los matraces
Sakaguchi (capacidad: 500 ml), y luego se incubó con cul-
tivos al sesgo de 2 días de Pseudomonas schuykiliensis
IAM 1126. El organismo se desarrolló en el medio a 30°C
15 durante 48 horas en un agitador. Seis horas después de ha-
ber comenzado el desarrollo, se añadieron al medio 100 mg
de substancia FR-1923. Después de que el desarrollo se hu-
bo completado, se obtuvieron 9,5 litros de supernatante
del caldo cultivado con centrifugación a 5.000 rpm durante
20 15 minutos, que se concentró bajo presión reducida. Un li-
tro del concentrado se dializó durante la noche contra 10
litros de agua y se sometió a fraccionación con sulfato de
amonio, tras de lo cual, 50 ml de los precipitados entre
40 y 60% de saturación con sulfato de amonio se hicieron
25 pasar a una columna de DEAE-Sephadex A-24 (marca comercial
de Pharmacia AB) saturada mediante solución amortiguadora
de fosfato 1/15 M. La solución pasada se hizo pasar a tra-
vés de una columna de hidroxapatita saturada mediante la
misma solución de amortiguador de fosfato como se ha men-
30 cionado arriba, después se eluyó el compuesto objeto con

1 500 mililitros de solución de amortiguador de fosfato 0,2
M. Quinientos mililitros del eluato se sometieron a fraccio
nación con sulfato de amonio. Se disolvieron los precipita
dos hasta saturación 70% con sulfato de amonio en 50 milili
5 tros de solución de amortiguador de fosfato 1/15 M (pH 7,2)
(al cual se hace referencia más adelante como Material I
Procesado de *Pseudomonas schuykiliensis*). Se añadió a 0,2
ml de la solución, 0,2 ml de una solución acuosa (pH 7,0)
que contenía 10 mg de 3- $\left[2-\left\{4-(3\text{-amino-3-carboxipropoxi}\right.\right.$
10 $\left.\left.\text{fenil}\right\}\text{glicinamido}\right]-1-(\text{alfa-carboxi-4-hidroxibencil})-2\text{-aze-}$
tidinona. La mezcla se ajustó a pH 8,0 y luego se incubó a
37°C durante 30 minutos, tras de lo cual se determinaron 4
mg de 3-ANA en la mezcla de reacción.

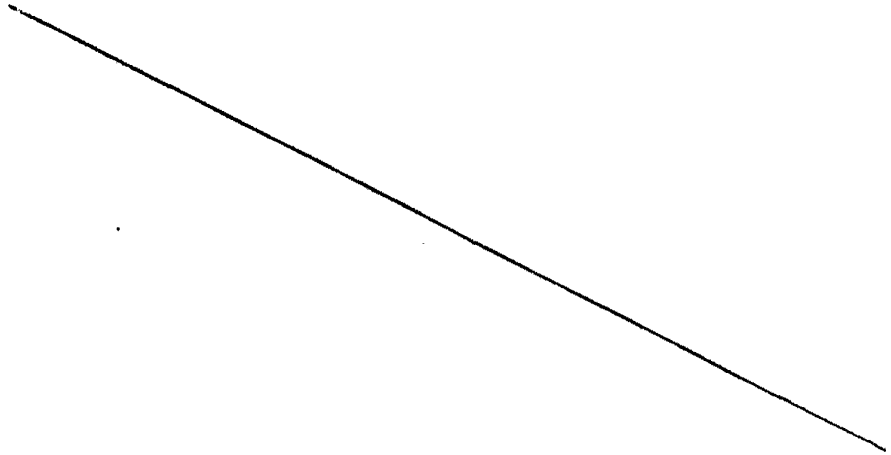
Ejemplo 4

15 Diez litros del caldo cultivado de *Pseudomonas*
schuykiliensis IAM 1126, preparado substancialmente de la
misma manera como se describe en el Ejemplo 3, se centrifu-
garon a 5.000 rpm durante 15 minutos para dar 9,5 litros
del supernatante. El supernatante se concentró bajo presión
20 reducida para dar un litro del concentrado, que se dializó
durante la noche contra 10 litros de agua y luego se some-
tió a fraccionación con sulfato de amonio. Se hicieron pa-
sar 50 ml de precipitados entre 40 y 60% de saturación con
sulfato de amonio a través de una columna de DEAE-Sephadex
25 A-25 saturada por solución de amortiguador de fosfato 1/15
M. Se vertieron 25 microlitros de la solución pasada en cada
uno de dos tubos de prueba y a cada uno de ellos se añadie-
ron 25 microlitros de solución de amortiguador de fosfato
1/15 M (pH 7,2) que contenía 0,5 mg de 1-(alfa-carboxi-4-hi-
30 droxibencil)-3- $\left\{2-(4\text{-hidroxifenil})\text{glicinamido}\right\}-2\text{-azetidinsona}$

1 ó 1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-3- \square 3-(3-indolil)-2-ami
nopropionamido \square -2-azetidiona. Cada mezcla se incubó a
37°C durante 4 horas. Después de la reacción, la 3-ANA pro-
5 ducida en la mezcla de reacción, se determinó mediante el
método arriba mencionado para determinar con la excepción
de que una mezcla de n-propanol y agua (7:3) se usó como
disolvente de revelado. Cada una proporcionó: 0,1 mg.

Ejemplo 5

Cada cepa de bacterias de los Microorganismos
10 Nos. 2 a 31, Actinomycetes de Microorganismos Nos. 32 a 41,
molde de Microorganismos Nos. 42 a 46 y levaduras de Micro-
organismos Nos. 47 a 49, los cuales todos se mencionan en
la Tabla I, se desarrollaron en un medio y condiciones de
cultivo como se indica en la Tabla 2 que sigue en un agita-
15 dor. Tras el cultivo, se añadió a cada caldo cultivado
(0,2 ml), 0,2 ml de una solución acuosa (pH 8,2) que conte-
nía 10 mg de 3- \square 2-{4-(3-amino-3-carboxipropoxi)-fenil}gli-
cinamido \square -1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidiona.
Subsecuentemente, cada una de las mezclas se incubó a 37°C
20 durante cuatro horas y veinticuatro horas después de haber-
se iniciado la incubación, se determinó la 3-ANA producida
en cada mezcla de reacción. Los resultados se ilustran en
la Tabla 3 que sigue.



1

TABLA 2

	Bacteria	Actinomycetes	Moho y Levadura
	medio "Kyokuto powdery Bouillon" 2% (siempre que en el caso del género de Acetobacter y Gluconobacter, se añada 0,5% de carbonato de calcio al medio)	Lactosa 1,0% Peptona 0,5% Extracto de res 0,5% Cloruro de sodio 0,5%	Glucosa 0,4% Peptona 1,0% Extracto de levadura 0,4% Carbonato de calcio 0,3%
5			
10			
	pH del medio	7,2	7,2
	Temperatura del cultivo	30°C	30°C
15	Tiempo de cultivo	48 horas	96 horas

Tabla 3

Rendimiento (mg) de 3-ANA

Microorganismo número	4 horas después de comenzar la incubación	24 horas después de comenzar la incubación
2	1,3	1,5
3	1,3	1,5
4	0,8	1,5
25	5	0,8
	6	0,8
	7	0,2
	8	0,2
	9	2,2
30	10	0,8
		0,96

1

Tabla 3 (continuación)

	11	0,2	0,96
	12	0,8	0,96
	13	0,8	0,96
5	14	0,04	0,28
	15	0,2	0,28
	16	0,2	0,08
	17	0,8	0,96
	18	0,8	0,96
10	19	0,8	0,96
	20	0,8	0,96
	21	0,8	-
	22	0,8	-
	23	0,2	-
15	24	1,3	-
	25	1,3	-
	26	0,8	-
	27	0,8	-
	28	0,8	-
20	29	0,8	-
	30	1,3	-
	31	0,8	-
	32	0,8	-
	33	1,3	-
25	34	1,3	-
	35	0,8	-
	36	0,04	-
	37	0,2	-
	38	0,2	-
30	39	0,8	-

1

Tabla 3 (continuación)

	40	0,8	-
	41	0,2	-
	42	0	0,28
5	43	0	0,08
	44	0,2	0,2
	45	0,04	0,08
	46	0,2	0,28
	47	0	0,96
10	48	0	0,28
	49	0	0,08

Ejemplo 6

Se añadió 0,5 ml de solución de amortiguador de fosfato 1/15 M que contenía 10 mg de 3- \square -2- $\left\{4-(3\text{-benzamido-3-carboxipropoxi})\text{fenil}\right\}$ glicinamido γ -1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona a 0,5 ml del Material Procesado I de Pseudomonas schuykiliensis, obtenida en el Ejemplo 3. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas, después, la 3-ANA producida en la mezcla de reacción, se determinó mediante el método arriba mencionado para la determinación con la excepción de que una mezcla de n-butanol y ácido acético y agua (4:1:2) se usó como disolvente de revelado (valor RF: 0,50). Rendimiento, 1,2 mg.

15

20

Ejemplo 7

25

Se añadió 0,5 ml de solución de amortiguador de fosfato 1/15 M (pH 7,2) que contenía 10 mg de 3- \square -2- $\left\{4-(3\text{-acetamido-3-carboxipropoxi})\text{fenil}\right\}$ glicinamido γ -1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona a 0,5 ml del Material Procesado Y de Pseudomonas schuykilienses, obtenido en el Ejemplo 3. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas, des-

30

1 pués la 3-ANA, producida en la mezcla de reacción se deter-
minó por el método arriba descrito para determinación con
excepción de que una mezcla de n-propanol y agua (7:3) se
usó como disolvente de revelado. (Valor Rf: 0,46). Rendi-
5 miento: 0,7 mg):

Ejemplo 8

Se disolvieron 50 unidades de Aminopeptidasa M
Nº A-7761 (marca comercial de Sigma Chemical Co.) (deriva-
do de microsomas de riñón de cerdo), en 40 ml de una solu-
10 ción acuosa (pH 8,0 que contenía 2 g de 3-[2-(4-(3-amino-
-3-carboxipropoxi)fenil)glicinamido]-1-(alfa-carboxi-4-hi-
droxibencil)-2-azetidínona, y la mezcla se incubó a 37°C
durante 24 horas. Tras la incubación, se determinaron 450
mg de 3-ANA en la mezcla de reacción.

15 Subsecuentemente, la mezcla de reacción se concen-
tró bajo presión reducida para dar 4 ml del concentrado,
que se ajustó a pH de 2,0 y luego se sometió a una cromato-
grafía de columna usando celulosa (disolvente de revelado:
n-butanol saturado con agua). Se recogieron 150 ml de frac-
20 ciones que contenían 3-ANA y se concentraron bajo presión
reducida. Se añadieron 50 ml de éter etílico a 5 ml del
concentrado para dar precipitados, que se obtuvieron median-
te filtración y secado para dar 85 mg de un polvo blanco.
El polvo blanco se disolvió en un pequeño volumen de meta-
25 nol y la mezcla se dejó reposar durante la noche para dar
65 mg de cristales blancos de 3-ANA. P. de f. 203-206°C
(Descomposición).

1

REIVINDICACIONES

5

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:

10

15

20

1ª.- Un procedimiento para preparar 3-amino-1--(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona, su sal o su derivado en el grupo carboxi, que comprende N-desacilar 3-(alfa-sustituído o insustituído glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona, su sal o su derivado en el grupo carboxi en presencia de un caldo cultivado de un microorganismo o su material procesado o una aminopeptidasa derivada de un cuerpo animal, que sea capaz de N-desacilar la 3-(alfa-sustituído o insustituído glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona, su sal o su derivado en el grupo carboxi para producir 3-amino-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona, su sal o su derivado en el grupo carboxi.

25

30

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual la N-desacilación se lleva a cabo en presencia de un caldo cultivado de un microorganismo elegido del género Pseudomonas, Xanthomonas, Acetobacter, Glucobacter, Escherichia, Proteus, Staphylococcus, Aeromonas, Protaminobacter, Bacillus, Azotobacter, Agrobacterium, Brevibacterium, Micrococcus, Microbacterium, Mycobacterium, Achromobacter, Aerobacter, Alcaligenes, Corynebacterium, Flavobacterium, Kluyvera, Arthrobacter, Sarcina, Serratia,

1 Streptomyces, Nocardia, Micromonospora, Thermopolyspora,
Amorphosporancium, Spirillospora, Actinoplanes, Asperci-
llus, Penicillium, Rhizopus, Mucor, Rhodotorula, Endomyco-
opsis y Lipomyces, o su material procesado.

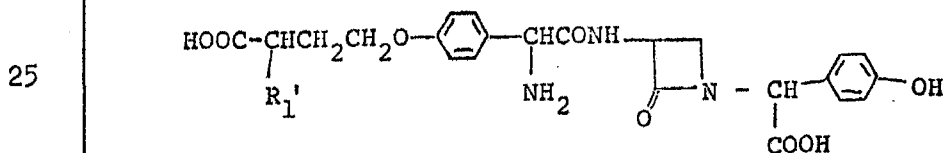
5 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª, en el cual la N-desacilación se lleva a cabo en
presencia de aminopeptidasa M (E.C. 3,4,1,2).

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª ó la 2ª, en el cual el caldo de cultivo del micro
10 organismo se usa.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª ó la 2ª, en el cual se usa el material procesado
obtenido del caldo de cultivo del microorganismo.

6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
15 cación 5ª, en el cual el material procesado es un filtrado,
supernatante, suspensión de células o preparación purifica-
da obtenida del caldo de cultivo de una manera convencio-
nal.

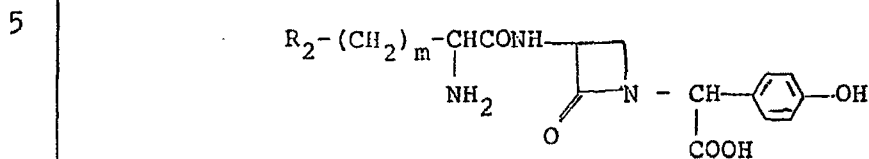
7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
20 cación 1ª, en el cual la 3-(alfa-substituído o insubstituí-
do glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidi-
nona es un compuesto representado por la fórmula:



en donde R'₁ es un grupo amino o acilamino.

30 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindica

1 ción 1ª, en el cual la 3-(alfa-substituído o insubstituído
glicinamido)-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona
es un compuesto representado por la fórmula



10 en donde R_2 es un grupo arilo o heterocíclico y m es un entero de 0 a 4.

9ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que R'_1 es un grupo alcanoilamino (C_1-C_6).

15 10ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el cual R'_1 es un grupo aroilamino (C_7-C_{12}).

11ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el cual R'_1 es amino.

20 12ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9ª en el cual el grupo alcanoilamino (C_1-C_6) es acetilamino.

13ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10ª, en el que el grupo aroilamino (C_7-C_{12}) es benzoilamino.

25 14ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el cual el arilo substituído es p-hidroxifenilo.

15ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el cual el grupo heterocíclico es 3-indolilo.

30 16ª.- Un procedimiento para preparar 3-amino-1-(alfa-carboxi-4-hidroxibencil)-2-azetidionona.

1 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

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

Madrid, 21. OCT. 1975

P.A.

Oscar de Elzaburu
Por Poder

